

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

XIII издание

Том II

**Москва
2015**

Содержание

1.4. Лекарственные формы и методы их анализа

1.4.1. Лекарственные формы

- 1.4.1.1. Лекарственные формы (ОФС.1.4.1.0001.15)
- 1.4.1.2. Аэрозоли и спреи (ОФС.1.4.1.0002.15)
- 1.4.1.3. Глазные лекарственные формы (ОФС.1.4.1.0003.15)
- 1.4.1.4. Гранулы (ОФС.1.4.1.0004.15)
- 1.4.1.5. Капсулы (ОФС.1.4.1.0005.15)
- 1.4.1.6. Лекарственные формы для ингаляций (ОФС.1.4.1.0006.15)
- 1.4.1.7. Лекарственные формы для парентерального применения (ОФС.1.4.1.0007.15)
- 1.4.1.8. Мази (ОФС.1.4.1.0008.15)
- 1.4.1.9. Пластыри медицинские (ОФС.1.4.1.0009.15)
- 1.4.1.10. Порошки (ОФС.1.4.1.0010.15)
- 1.4.1.11. Растворы (ОФС.1.4.1.0011.15)
- 1.4.1.12. Сиропы (ОФС.1.4.1.0012.15)
- 1.4.1.13. Суппозитории (ОФС.1.4.1.0013.15)
- 1.4.1.14. Суспензии (ОФС.1.4.1.0014.15)
- 1.4.1.15. Таблетки (ОФС.1.4.1.0015.15)
- 1.4.1.16. Трансдермальные пластыри (ОФС.1.4.1.0016.15)
- 1.4.1.17. Эмульсии (ОФС.1.4.1.0017.15)
- 1.4.1.18. Настои и отвары (ОФС.1.4.1.0018.15)
- 1.4.1.19. Настойки (ОФС.1.4.1.0019.15)
- 1.4.1.20. Сборы (ОФС.1.4.1.0020.15)
- 1.4.1.21. Экстракты (ОФС.1.4.1.0021.15)
- 1.4.1.22. Гранулы резано-прессованные (ОФС.1.4.1.0022.15)

1.4.2. Фармацевтико-технологические испытания лекарственных форм

1.4.2.1. Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц

(ОФС.1.4.2.0001.15)

1.4.2.2. Извлекаемый объем *(ОФС.1.4.2.0002.15)*

1.4.2.3. Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального

применения *(ОФС.1.4.2.0003.15)*

1.4.2.4. Истираемость таблеток *(ОФС.1.4.2.0004.15)*

1.4.2.5. Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах

(ОФС.1.4.2.0005.15)

1.4.2.6. Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения *(ОФС.1.4.2.0006.15)*

1.4.2.7. Масса (объем) содержимого упаковки *(ОФС.1.4.2.0007.15)*

1.4.2.8. Однородность дозирования *(ОФС.1.4.2.0008.15)*

1.4.2.9. Однородность массы дозированных лекарственных форм

(ОФС.1.4.2.0009.15)

1.4.2.10. Определение времени полной деформации суппозитория на липофильной основе *(ОФС.1.4.2.0010.15)*

1.4.2.11. Прочность таблеток на раздавливание *(ОФС.1.4.2.0011.15)*

1.4.2.12. Распадаемость суппозитория и вагинальных таблеток

(ОФС.1.4.2.0012.15)

1.4.2.13. Распадаемость таблеток и капсул *(ОФС.1.4.2.0013.15)*

1.4.2.14. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм

(ОФС.1.4.2.0014.15)

1.4.2.15. Растворение для суппозитория на липофильной основе

(ОФС.1.4.2.0015.15)

1.4.2.16. Степень сыпучести порошков *(ОФС.1.4.2.0016.15)*

1.4.2.17. Растворение для трансдермальных пластырей *(ОФС.1.4.2.0017.15)*

1.5. Лекарственное растительное сырье, фармацевтические субстанции растительного происхождения, лекарственные растительные препараты и методы их анализа

1.5.1. Морфологические группы лекарственного растительного сырья

1.5.1.1. Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения (ОФС.1.5.1.0001.15)

1.5.1.2. Травы (ОФС.1.5.1.0002.15)

1.5.1.3. Листья (ОФС.1.5.1.0003.15)

1.5.1.4. Цветки (ОФС.1.5.1.0004.15)

1.5.1.5. Кора (ОФС.1.5.1.0005.15)

1.5.1.6. Корни, корневища, луковичи, клубни, клубнелуковичи (ОФС.1.5.1.0006.15)

1.5.1.7. Плоды (ОФС.1.5.1.0007.15)

1.5.1.8. Семена (ОФС.1.5.1.0008.15)

1.5.1.9. Почки (ОФС.1.5.1.0009.15)

1.5.2. Лекарственные средства растительного происхождения

1.5.2.1. Эфирные масла (ОФС.1.5.2.0001.15)

1.5.2.2. Масла жирные растительные (ОФС.1.5.2.0002.15)

1.5.3. Методы анализа лекарственного растительного сырья, фармацевтических субстанций растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов

1.5.3.1. Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0001.15)

1.5.3.2. Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов (ОФС.1.5.3.0002.15)

1.5.3.3. Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов (ОФС.1.5.3.0003.15)

1.5.3.4. Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0004.15)

1.5.3.5. Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте (ОФС.1.5.3.0005.15)

1.5.3.6. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0006.15)

1.5.3.7. Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов (ОФС.1.5.3.0007.15)

1.5.3.8. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0008.15)

1.5.3.9. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0009.15)

1.5.3.10. Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0010.15)

1.5.3.11. Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0011.15)

1.5.3.12. Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья (ОФС.1.5.3.0012.15)

1.7. Группы иммунобиологических лекарственных препаратов и методы их анализа

1.7.1. Группы иммунобиологических лекарственных препаратов

1.7.1.1. Аллергены (ОФС.1.7.1.0001.15)

1.7.1.2. Бактериофаги (ОФС.1.7.1.0002.15)

1.7.1.3. Бифидосодержащие пробиотики (ОФС.1.7.1.0003.15)

1.7.1.4. Вакцины и анатоксины (ОФС.1.7.1.0004.15)

1.7.1.5. Колисодержащие пробиотики (ОФС.1.7.1.0005.15)

1.7.1.6. Лактосодержащие пробиотики (ОФС.1.7.1.0006.15)

1.7.1.7. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК (ОФС.1.7.1.0007.15)

1.7.1.8. Пробиотики (ОФС.1.7.1.0008.15)

1.7.1.9. Споровые пробиотики (ОФС.1.7.1.0009.15)

1.7.2. Методы анализа иммунобиологических лекарственных препаратов

1.7.2.1. Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo* (ОФС.1.7.2.0001.15)

1.7.2.2. Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток (ОФС.1.7.2.0002.15)

1.7.2.3. Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина (ОФС.1.7.2.0003.15)

1.7.2.4. Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина (ОФС.1.7.2.0004.15)

1.7.2.5. Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин (ОФС.1.7.2.0005.15)

1.7.2.6. Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов (ОФС.1.7.2.0006.15)

1.7.2.7. Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флоккуляции (ОФС.1.7.2.0007.15)

1.7.2.8. Определение концентрации микробных клеток (ОФС.1.7.2.0008.15)

1.7.2.9. Определение специфической активности пробиотиков

(ОФС.1.7.2.0009.15)

1.7.2.10. Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи *(ОФС.1.7.2.0010.15)*

1.7.2.11. Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов *(ОФС.1.7.2.0011.15)*

1.7.2.12. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков *(ОФС.1.7.2.0012.15)*

1.7.2.13. Полимеразная цепная реакция *(ОФС.1.7.2.0013.15)*

1.7.2.14. Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин *(ОФС.1.7.2.0014.15)*

1.7.2.15. Общие принципы анализа цитокинов и интерферонов методом ВЭЖХ *(ОФС.1.7.2.0015.15)*

1.7.2.16. Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах *(ОФС.1.7.2.0016.15)*

1.7.2.17. Спектрофотометрическое определение фосфора в иммунобиологических лекарственных препаратах *(ОФС.1.7.2.0017.15)*

1.7.2.18. Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах *(ОФС.1.7.2.0018.15)*

1.7.2.19. Определение О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах *(ОФС.1.7.2.0019.15)*

1.7.2.20. Определение бычьего сывороточного альбумина в иммунобиологических лекарственных препаратах методом ракетного иммуноэлектрофореза *(ОФС.1.7.2.0020.15)*

1.7.2.21. Изоэлектрическое фокусирование *(ОФС.1.7.2.0021.15)*

1.7.2.22. Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот *(ОФС.1.7.2.0022.15)*

1.7.2.23. Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах *(ОФС.1.7.2.0023.15)*

- 1.7.2.24. Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0024.15)
- 1.7.2.25. Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0025.15)
- 1.7.2.26. Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0026.15)
- 1.7.2.27. Определение общего азота с реактивом Несслера в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0027.15)
- 1.7.2.28. Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0028.15)
- 1.7.2.29. Количественное определение 2-феноксэтанола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0029.15)
- 1.7.2.30. Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах (ОФС.1.7.2.0030.15)
- 1.7.2.31. Испытание на присутствие микоплазм (ОФС.1.7.2.0031.15)
- 1.7.2.32. Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания (ОФС.1.7.2.0032.15)
- 1.7.2.33. Метод иммуноферментного анализа (ОФС.1.7.2.0033.15)
- 1.7.2.34. Определение подлинности аллергенов (ОФС.1.7.2.0034.15)

1.8. Лекарственные препараты из крови и плазмы крови человека и животных и методы их анализа

1.8.1. Группы лекарственных препаратов из крови и плазмы крови человека и животных

- 1.8.1.1. Лекарственные препараты из плазмы крови человека (ОФС.1.8.1.0001.15)

- 1.8.1.2. Иммунобиологические лекарственные препараты (ОФС.1.8.1.0002.15)
- 1.8.1.3. Иммуноглобулины человека (ОФС.1.8.1.0003.15)
- 1.8.1.4. Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные (ОФС.1.8.1.0004.15)

1.8.2. Методы анализа лекарственных препаратов, полученных из крови и плазмы крови человека и животных

- 1.8.2.1. Иммунодиффузия в геле (ОФС.1.8.2.0001.15)
- 1.8.2.2. Иммуноэлектрофорез в агаровом геле (ОФС.1.8.2.0002.15)
- 1.8.2.3. Определение активности факторов свертывания крови (ОФС.1.8.2.0003.15)
- 1.8.2.4. Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека (ОФС.1.8.2.0004.15)
- 1.8.2.5. Определение анти-A и анти-B гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека (ОФС.1.8.2.0005.15)
- 1.8.2.6. Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ (ОФС.1.8.2.0006.15)
- 1.8.2.7. Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (ОФС.1.8.2.0007.15)
- 1.8.2.8. Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных (ОФС.1.8.2.0008.15)
- 1.8.2.9. Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы (ОФС.1.8.2.0009.15)

1.11. Радиофармацевтические лекарственные средства

- 1.11.1. Радиофармацевтические лекарственные препараты (ОФС.1.11.0001.15)

В настоящей общей фармакопейной статье рассматривается перечень лекарственных форм, приводятся общие требования к их производству, изготовлению, показателям и методам оценки качества.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Лекарственные средства – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Лекарственная форма – состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Лекарственные препараты – лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Фармацевтическая субстанция – лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Производство лекарственных средств – деятельность по производству лекарственных средств организациями-производителями лекарственных средств на одной стадии, нескольких или всех стадиях технологического процесса, а также по хранению и реализации произведенных лекарственных средств.

Изготовление – деятельность по изготовлению лекарственных средств, осуществляемая аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность, по рецептам на лекарственные препараты, по требованиям медицинских организаций, ветеринарных организаций, в соответствии с правилами изготовления и отпуска лекарственных препаратов, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

Стабильность – способность лекарственного средства сохранять химические, физические, микробиологические, биофармацевтические и фармакологические свойства в определенных границах на протяжении срока годности.

Путь введения – способ доставки лекарственного средства в организм человека или животного.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ПЕРЕЧЕНЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Все лекарственные формы могут быть иерархически классифицированы: по агрегатному состоянию, типу дисперсной системы, пути введения и типу высвобождения (таблица).

Таблица – Классификация лекарственных форм

Уровень	Классификационный признак			
1	Лекарственные формы по агрегатному состоянию			
	твердые	жидкие	мягкие	газообразные
2	Лекарственные формы по типу дисперсной системы			
	гомогенные		гетерогенные	комбинированные
3	Лекарственные формы по пути введения			
	для приема внутри	для наружного применения	для местного применения	для парентерального применения
4	Лекарственные формы по типу высвобождения			
	с обычным высвобождением		с модифицированным высвобождением	

К твердым лекарственным формам относятся таблетки, капсулы, порошки, гранулы, драже, пастилки, лиофилизаты, имплантаты, карандаши, тампоны, сборы, пленки и др.

Жидкие лекарственные формы – растворы, капли, сиропы, суспензии, эмульсии, жидкие экстракты, настойки, эликсиры, концентраты, шампуни, настои, отвары и др.

К мягким лекарственным формам относятся мази, кремы, гели, линименты, пасты, суппозитории, пластыри, жевательные резинки и др.

Газообразные лекарственные формы – газы медицинские, аэрозоли, спреи, ингаляционные лекарственные формы и др.

По типу дисперсной системы лекарственные формы могут быть гомогенными, гетерогенными и комбинированными.

По пути введения различают лекарственные формы для приема внутрь, наружного применения, местного применения и парентеральные лекарственные формы.

По типу высвобождения лекарственные формы могут иметь обычное и

модифицированное высвобождение. Модифицированное (нестандартное) высвобождение может быть замедленным непрерывным, прерывистым (пульсирующим), отсроченным и ускоренным.

Отнесение лекарственной формы к той или иной классификационной подгруппе определяет подходы к оценке ее качества.

В зависимости от пути введения и назначения лекарственной формы в перечень испытаний ее качества включаются испытания, отражающие, при необходимости, особенности данной лекарственной формы.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Производство лекарственных средств в различных лекарственных формах должно осуществляться в соответствии с Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Правила GMP распространяются на все виды лекарственных средств и устанавливают общие требования к организации их производства и контроля качества, а также специальные требования к организации производства отдельных видов лекарственных средств.

Изготовление лекарственных средств в различных лекарственных формах должно проводиться в соответствии с действующими требованиями к изготовлению лекарственных средств в аптечных организациях.

Нестерильные лекарственные формы производят и изготавливают с использованием материалов и методов, предотвращающих загрязнение и рост микроорганизмов и обеспечивающих их соответствие требованиям ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные лекарственные формы (парентеральные, глазные лекарственные формы, а также лекарственные формы, предназначенные для нанесения на поврежденную кожу и слизистые, лекарственные формы для новорожденных) производят и изготавливают с применением материалов и методов, предотвращающих загрязнение и обеспечивающих их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Оценку качества лекарственных препаратов в различных лекарственных формах проводят, как правило, по показателям качества, характеризующим конкретную лекарственную форму, а также по показателям качества действующего вещества/веществ и, при необходимости, вспомогательного вещества/веществ данного лекарственного препарата («Подлинность», «Количественное определение» и др.).

К показателям, которые являются обязательными для оценки качества лекарственного препарата независимо от лекарственной формы, относятся «Описание», «Подлинность», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота» (для нестерильных лекарственных форм) и «Стерильность» (для стерильных лекарственных форм).

Описание. Приводят сведения, которые наиболее полно характеризуют требования, предъявляемые к внешнему виду и органолептическим характеристикам (цвет, запах) лекарственного препарата в данной лекарственной форме.

Подлинность. Проводимые испытания определяются составом лекарственного препарата: действующими, реже вспомогательными веществами (антимикробными консервантами, антиоксидантами, стабилизаторами и др.), входящими в состав лекарственного препарата. Для оценки подлинности рекомендуется сочетание физико-химических (ВЭЖХ, ГХ, ТСХ и др.) и химических методов анализа.

Количественное определение. Данное испытание, как и определение подлинности, зависит от состава лекарственного препарата: действующих и вспомогательных веществ. Для количественного определения рекомендуется использовать физико-химические (ВЭЖХ, спектрофотометрия) и химические методы анализа (титриметрия), допускается применение других фармакопейных методов анализа.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, содержание определяемых веществ выражается в мг или ЕД в

одной дозе для дозированных лекарственных форм или в 1 г (мл) препарата для недозированных форм.

При введении в состав лекарственных препаратов антимикробных консервантов, метод их определения и критерии оценки их эффективности должны соответствовать требованиям ОФС «Определение эффективности антимикробных консервантов».

Микробиологическая чистота. Контролируется во всех нестерильных лекарственных формах в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Лекарственные препараты, предназначенные для использования на открытых ранах или на поврежденной коже, лекарственные формы для новорожденных, а также парентеральные и глазные лекарственные формы должны быть стерильными и проходить испытание в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Показатели качества лекарственного препарата могут определяться способом его производства (например, использование органических растворителей) и свойствами действующего вещества (способность к образованию изомеров, продуктов распада и др.).

Содержание *остаточных органических растворителей* в лекарственном препарате оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

В случае возможного наличия примесей в составе лекарственного препарата (например, в результате накопления примесей (продукты деструкции) в процессе хранения лекарственного препарата) необходимо контролировать их содержание по показателю «*Родственные примеси*».

Для отдельных лекарственных форм могут быть выделены характерные показатели качества.

Для твердых дозированных форм, трансдермальных пластырей, суппозиторий на липофильной основе, как правило, проводят испытание по показателю «Растворение».

Для таблеток, капсул, суппозитория и вагинальных таблеток может быть предусмотрена оценка распадаемости.

Порошки оценивают по показателям «Размер частиц», «Потеря в массе при высушивании».

Лекарственные формы для парентерального применения должны выдерживать требования по содержанию бактериальных эндотоксинов и/или пирогенов, видимых и невидимых механических включений.

Капли глазные должны выдерживать требования по содержанию видимых механических включений.

Для ряда лекарственных форм проводят оценку качества по показателям, которые контролируются на производстве. Например, для таблеток – «Истираемость таблеток» и «Прочность таблеток на раздавливание», для стерильных мазей – «Герметичность упаковки», для порошков определяют сыпучесть, угол естественного откоса, насыпной объем и др.

Для жидких лекарственных форм, представленных растворами, в отдельных случаях проводят оценку прозрачности, цветности, pH и осмоляльности.

Аэрозоли и спреи оцениваются по таким показателям, как «Герметичность упаковки», «Выход содержимого упаковки» (для недозированных аэрозолей и спреев), «Однородность массы дозы» (для дозированных аэрозолей и спреев) и др. Для аэрозолей для ингаляций оценивают аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц, респираторную фракцию и др.

Однородность массы. Дозированные лекарственные формы, в том числе в однократной индивидуальной упаковке, должны выдерживать испытание однородности массы для единицы дозированной лекарственной формы. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Если предусмотрено определение однородности дозирования, определение однородности массы не требуется.

Однородность дозирования. Дозированные лекарственные формы, в том числе в однократной индивидуальной упаковке, должны выдерживать испытание однородности дозирования в соответствии с ОФС «Однородность дозирования», если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытания проводят для недозированных лекарственных форм в соответствии с ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки», за исключением жидких лекарственных форм для парентерального применения и приема внутрь.

Извлекаемый объем. Испытание проводят для жидких лекарственных форм для приема внутрь в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем». Испытания не проводят для лекарственных форм в однократных упаковках, если в фармакопейную статью или нормативную документацию включено испытание на однородность дозирования.

Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения. Испытанию подвергаются лекарственные формы для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать качество лекарственного препарата в течение установленного срока годности в заявленных условиях хранения. Материалы первичной и вторичной упаковки должны быть разрешены для производства данного вида упаковки с учетом пути введения лекарственной формы.

МАРКИРОВКА

Для дозированных лекарственных форм приводят названия действующих веществ и их количества в одной дозе препарата, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Для недозированных лекарственных форм приводят названия действующих

веществ и их количества в определенном объеме (массе) лекарственного препарата. Для парентеральных лекарственных форм, лекарственных форм для ингаляций, лекарственных форм для наружного и (или) местного применения, глазных лекарственных форм указывают названия действующих веществ, их количества и перечень названий всех вспомогательных веществ. Для лекарственных форм для инфузий приводят названия действующих и вспомогательных веществ и их количества.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». Условия хранения должны обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение всего установленного срока его годности в заявленном виде упаковки.

СРОК ГОДНОСТИ

Сроки годности лекарственных средств в различных лекарственных формах устанавливают в соответствии с требованиями ОФС «Сроки годности лекарственных средств».

Аэрозоли – лекарственная форма, представляющая собой растворы, эмульсии или суспензии действующих веществ, находящиеся под давлением пропеллента в герметичной упаковке (аэрозольный баллон), снабженной клапанно-распылительной системой, которая обеспечивает высвобождение лекарственного средства в виде дисперсии твердых или жидких частиц в газе, размер которых соответствует пути введения.

Спреи – это аэрозоли, не содержащие пропеллента, высвобождение содержимого которых происходит за счет давления воздуха, создаваемого с помощью механического распылителя насосного типа или при сжатии полимерной упаковки. По сравнению с аэрозолями спреи являются более грубо-дисперсной системой.

Аэрозоли представляют собой двухфазные (газ и жидкость) или трехфазные (газ, жидкость и твердое вещество или жидкость) системы. Двухфазные аэрозоли состоят из раствора действующего вещества в сжиженном пропелленте с добавлением растворителей, обеспечивающих растворимость действующих веществ. Трехфазные аэрозоли состоят из суспензии или эмульсии действующих веществ и пропеллента.

К трехфазным аэрозолям относятся пенные аэрозоли, которые представляют собой эмульсии, содержащие действующие вещества, поверхностно-активные вещества, водные или неводные растворители и пропелленты. Если пропеллент входит в состав дисперсной фазы (эмульсия типа «масло в воде»), при выпуске содержимого образуется стабильная пена.

Спреи представляют собой однофазные (жидкость) или двухфазные (жидкость и твердое вещество или жидкость) системы.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Вспомогательные вещества в составе аэрозолей и спреев (растворители, пропелленты, поверхностно-активные вещества, пленкообразователи, корригенты, антимикробные консерванты, антиоксиданты и др.) должны быть разрешены к медицинскому применению, обеспечивать оптимальные технологические характеристики лекарственной формы, быть совместимы с другими компонентами лекарственной формы и материалом упаковки. Вспомогательные вещества в составе аэрозолей для ингаляций не должны неблагоприятно влиять на функцию слизистой оболочки респираторного тракта.

Растворители: вода, спирт этиловый, жирные масла растительного и животного происхождения, минеральные масла, глицерин, этилацетат, хлористый этил, пропиленгликоль, димексид (диметилсульфоксид), полиэтиленоксиды с различными молекулярными массами, полисилоксановые соединения, этилцеллюлозы и др.

Поверхностно-активные вещества: полисорбаты (твины), спены, пентол, препарат ОС-20, эмульсионные воски, эмульгатор № 1, эмульгатор Т-2, спирты синтетические жирные первичные, триэтаноламиновые соли высших жирных кислот, олеиновая кислота и др.

Пленкообразователи: производные целлюлозы, акриловой кислоты и др.

Корригенты: сахар, лимонная кислота, сорбит, эфирные масла, тимол, ментол и др.

Антимикробные консерванты: метилпарагидроксибензоат, натрия пропилпарагидроксибензоат, этилпарагидроксибензоат, сорбиновая и бензойная кислоты, натрия бензоат, этоний, катамин АБ и др.

Антиоксиданты: бутилокситолуол, бутилксианизол, витамин Е, аскорбиновая кислота и др.

Пропелленты (используются в аэрозолях): сжиженные газы, например, низкомолекулярные углеводороды парафинового ряда, такие как пропан и

бутан, сжатые газы, такие как азот, азота закись, углерода диоксид, и галогенированные углеводороды (фреоны или хладоны). Для создания оптимальных физико-химических характеристик аэрозоля могут быть использованы смеси пропеллентов.

Аэрозоли и спреи помещают в упаковку, которая должна быть изготовлена из материала, инертного по отношению к содержимому упаковки: металла, стекла, пластмассы или их комбинаций. Стеклянные емкости аэрозолей должны быть защищены пластмассовым покрытием. Аэрозольные баллоны должны выдерживать внутреннее давление не менее 1 МПа при 20 °С.

В зависимости от типа и назначения упаковки должны быть снабжены распылительным устройством непрерывного действия (недозированные аэрозоли и спреи) или дозирующим распылительным устройством (дозированные аэрозоли и спреи). Материалы, используемые в производстве распылительных устройств (пластмасса, резина, металл), должны быть инертны по отношению к содержимому упаковки.

Распылительное устройство должно регулировать высвобождение содержимого упаковки во время использования: скорость и полноту высвобождения, размер частиц дисперсии, однородность дозирования. Клапанный распылительное устройство аэрозолей должно обеспечивать герметичность упаковки в нерабочем состоянии.

ИСПЫТАНИЯ

В зависимости от лекарственной формы контроль качества аэрозолей и спреев включает в себя оценку давления в упаковке, герметичности упаковки, проверку клапана, определение процента выхода содержимого упаковки, средней массы дозы, количества доз в упаковке, однородности дозирования, однородности массы. Для неингаляционных аэрозолей и спреев, содержащих суспензию действующих веществ, определяют размер частиц, для ингаляционных аэрозолей – респирабельную фракцию.

Для аэрозолей и спреев, представляющих собой эмульсии и суспензии, допускается расслаивание в процессе хранения, однако они должны легко

реэмульгироваться и ресуспендироваться при встряхивании для обеспечения равномерного распределения действующего вещества в лекарственном средстве.

Аэрозоли, предназначенные для ингаляций, должны соответствовать ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Давление в упаковке. Измерение давления проводят только для аэрозолей, в которых пропеллентами являются сжатые газы.

Упаковки выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и манометром (класс точности 2.5) измеряют давление внутри упаковки, которое должно соответствовать требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации, но не должно превышать 0,8 МПа (8 кгс/см²).

Герметичность упаковки (для аэрозолей)

Метод 1. Аэрозольный баллон без колпачка и распылителя или насадки полностью погружают в водяную баню при температуре $(45 \pm 5) ^\circ\text{C}$ не менее чем на 15 мин и не более чем на 30 мин для стеклянного баллона и не менее чем на 10 мин и не более чем на 20 мин для металлического. Толщина слоя воды над штоком клапана должна быть не менее 1 см. Не должно наблюдаться выделение пузырьков газа.

Метод 2. Отбирают 12 ранее не использовавшихся аэрозольных упаковок. Каждую упаковку без колпачка и распылителя или насадки взвешивают с точностью до 0,001 г (m_0) и оставляют в вертикальном положении при комнатной температуре на срок не менее 3 сут. Затем аэрозольную упаковку опять взвешивают с точностью до 0,001 г (m_1).

Отмечают продолжительность испытания в часах (T).

Освобождают аэрозольную упаковку от содержимого в соответствии со способом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Взвешивают пустую упаковку с точностью до 0,001 г (m_2), рассчитывают среднюю массу содержимого с точностью до 0,001 г (m_3) по формуле:

$$m_3 = \frac{(m_0 - m_2)}{n},$$

где n – количество аэрозольных упаковок, подвергшихся испытанию.

Рассчитывают скорость утечки содержимого упаковки в граммах в год (V_m) по формуле:

$$V_m = \frac{365 \cdot 24 \cdot (m_0 - m_1) \cdot 1000}{T}.$$

Рассчитывают скорость утечки содержимого упаковки в год в процентах от средней массы ($V_{\%}$) по формуле:

$$V_{\%} = \frac{V_m \cdot 100}{m_3}.$$

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, среднегодовая скорость утечки для 12 упаковок не должна превышать 3,5 % от средней массы содержимого упаковки и ни для одной из них не должна превышать 5,0 %. Если хотя бы для одной упаковки скорость утечки превышает 5,0 % в год, но ни для одной из упаковок не превышает 7,0 %, испытание на утечку проводят еще на 24 упаковках. Не более 2 упаковок из 36 могут иметь скорость утечки больше 5,0 % и ни для одной из них скорость утечки не должна превышать 7,0 % в год.

Если масса содержимого упаковки менее 15 г, средняя скорость утечки для 12 упаковок не должна превышать 525 мг/год и ни для одной из них не должна превышать 750 мг/год. Если хотя бы для одной упаковки скорость утечки превышает 750 мг/год (но не более 1,1 г/год), то испытание на утечку проводят еще на 24 упаковках. Не более 2 упаковок из 36 могут иметь скорость утечки больше 750 мг/год и ни для одной упаковки из 36 скорость утечки не должна превышать 1,1 г/год.

Выход содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных аэрозолей и спреев. Упаковку взвешивают вместе с распылителем или насадкой с точностью до 0,01 г (m_4). Нажатием на распылитель или насадку из упаковки удаляют все содержимое и снова взвешивают упаковку вместе с распылителем или насадкой с точностью до 0,01 г (m_5).

Выход содержимого в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_3 - m_5}{m_6} \cdot 100,$$

где m_6 – масса содержимого, указанная на этикетке, г (или полученная путем умножения номинального объема на плотность препарата).

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, процент выхода содержимого упаковки должен составлять не менее 90 %, и результатом считают среднее арифметическое, полученное при определении процента выхода содержимого из 3 упаковок.

Однородность массы дозы. Испытание проводят для дозированных аэрозолей и спреев, содержащих растворы. Испытание для ингаляционных аэрозолей проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для ингаляций» (испытание «Однородность доставляемой дозы»).

Контроль данного показателя должен проводиться не только для доз, высвобождаемых из одной упаковки, но и для доз, полученных из разных упаковок. Процедура отбора доз должна включать в себя отбор доз в начале, в середине и в конце использования препарата.

Высвобождают одну дозу и отбрасывают ее. Спустя не менее 5 с встряхивают упаковку в течение 5 с, снова высвобождают и отбрасывают одну дозу. Повторяют указанную процедуру еще 3 раза, если иначе не указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Взвешивают упаковку. Встряхивают упаковку в течение 5 с, высвобождают и отбрасывают одну дозу, снова взвешивают упаковку. По разности вычисляют массу высвободившейся дозы.

Испытание повторяют еще для 9 доз, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Рассчитывают среднюю массу дозы и отклонения индивидуальных значений от средней массы дозы.

Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если не более 1 из 10 индивидуальных масс отклоняется от средней массы на величину, превышающую 25 %, при этом не более чем на 35 %. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75 – 125 %, испытание повторяют с 20 другими доза-

ми. Не более 3 из 30 значений могут выходить за пределы 75 – 125 %, и все значения должны быть в пределах от 65 до 135 %.

Количество доз в упаковке. Испытание проводят для дозированных аэрозолей и спреев.

Метод 1. Выпускают содержимое одной упаковки, высвобождая дозы с интервалом не менее 5 с. Регистрируют количество высвобожденных доз.

Допускается проводить испытание одновременно с определением однородности дозирования.

Метод 2. Упаковку взвешивают вместе с распылителем или насадкой с точностью до 0,01 г (m_2). Нажимая на распылитель или насадку, из упаковки выпускают все содержимое и снова взвешивают упаковку вместе с распылителем или насадкой с точностью до 0,01 г (m_5).

Среднее количество доз ($n_{\text{ср}}$) в одной упаковке вычисляют по формуле:

$$n_{\text{ср}} = \frac{m_2 - m_5}{m_{\text{ср}}},$$

где $m_{\text{ср}}$ — средняя масса одной дозы, г.

Полученное в результате испытания количество доз должно быть не менее указанного на этикетке.

Размер частиц. Испытание проводят для неингаляционных аэрозолей и спреев, содержащих суспензию действующих веществ. Методики определения и требования к размеру частиц должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Респирабельная фракция. Испытание проводят для ингаляционных аэрозолей в соответствии с ОФС «Аэродинамическое распределение мелко-дисперсных частиц».

Однородность дозирования. Испытание проводят для дозированных аэрозолей и спреев, содержащих эмульсии или суспензии. Испытание для ингаляционных аэрозолей проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Контроль данного показателя должен проводиться не только для доз,

высвобождаемых из одной упаковки, но и для доз, полученных из разных упаковок. Процедура отбора доз должна включать в себя отбор доз в начале, в середине и в конце использования препарата.

Испытание проводят с использованием аппарата или установки, способных к количественному удерживанию дозы, выпущенной из распылительного устройства. Встряхивают упаковку в течение 5 с, высвобождают и отбрасывают одну дозу. Спустя не менее 5 с снова встряхивают упаковку в течение 5 с, высвобождают и отбрасывают одну дозу. Повторяют указанную процедуру еще 3 раза, если иначе не указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Через 5 с выпускают одну дозу в приемник аппарата. Содержимое приемника собирают путем последовательных промываний и определяют содержание действующего вещества в объединенных промывных водах.

Испытание повторяют еще для 9 доз, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации.

Препарат выдерживает испытание, если 9 из 10 результатов находятся в пределах от 75 до 125 % от среднего значения, а все результаты находятся в пределах от 65 до 135 %. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75 – 125 %, испытание повторяют с 20 другими дозами. Не более 3 из 30 значений могут выходить за пределы 75 – 125 %, и все значения должны быть в пределах от 65 до 135 %.

Для аэрозолей и спреев, содержащих несколько действующих веществ, тест на однородность дозирования должен быть выполнен для каждого вещества.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». В маркировке аэрозолей должны быть предусмотрены предупредительные надписи: «Хранить вдали от отопительной системы и прямых солнечных лучей»,

«Не вскрывать», «Предохранять от падений и ударов» и другие при необходимости.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Глазные лекарственные формы**ОФС.1.4.1.0003.15****Взамен ГФ X, ст. 319,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Глазные лекарственные формы представляют собой стерильные жидкие, мягкие или твердые лекарственные формы, предназначенные для местного применения (на глазном яблоке и/или конъюнктиве), инъекционного и имплантационного введения в ткани глаза.

Жидкие глазные лекарственные формы для местного применения:

- капли глазные;
- примочки глазные.

Мягкие глазные лекарственные формы для местного применения:

- мази глазные;
- гели глазные.

Твердые глазные лекарственные формы для местного применения:

- пленки глазные.

Твердые глазные лекарственные формы для приготовления капель глазных:

- таблетки для приготовления капель глазных;
- порошок для приготовления капель глазных;
- лиофилизат для приготовления капель глазных.

Жидкие инъекционные глазные лекарственные формы:

- раствор для субконъюнктивального введения;
- раствор для внутриглазного введения;
- раствор для парабульбарного введения.

Твердые глазные лекарственные формы для приготовления жидких инъекционных глазных лекарственных форм:

- лиофилизат для приготовления раствора для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения;
- порошок для приготовления раствора для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения.

Твердые глазные лекарственные формы для имплантационного применения – имплантат глазной.

Капли глазные – жидкие лекарственные формы, представляющие собой истинные растворы, растворы высокомолекулярных соединений, тончайшие суспензии или эмульсии, содержащие одно или более действующих веществ, предназначенные для инстилляции в глаз.

Примочки глазные – жидкие лекарственные формы, представляющие собой водные растворы, предназначенные для смачивания и промывания глаз, а также для пропитывания материалов, накладываемых на глаз.

Мази глазные, гели глазные – мягкие лекарственные формы, содержащие одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в подходящей основе, предназначенные, как правило, для нанесения на конъюнктиву. Гели глазные могут также наноситься на веки и роговицу.

Пленки глазные – твердые дозированные лекарственные формы, состоящие из пленкообразователя и одного или нескольких лекарственных веществ, предназначенные для помещения в конъюнктивальную полость.

Таблетки для приготовления капель глазных – таблетки, которые непосредственно перед применением растворяют или диспергируют в соответствующей назначению жидкости для получения капель глазных.

Порошки и лиофилизаты для приготовления капель глазных – порошки и лиофилизаты, которые непосредственно перед использованием растворяют или диспергируют в соответствующей назначению жидкости для получения капель глазных.

Инъекционные глазные лекарственные формы – жидкие дозированные

лекарственные формы, представляющие собой водные растворы, предназначенные для инъекционного введения в ткани глаза, или твердые дозированные лекарственные формы, предназначенные для приготовления жидких инъекционных лекарственных форм. К ним относятся растворы для субконъюнктивального введения, растворы для внутриглазного введения, растворы для парабульбарного введения, порошки и лиофилизаты для приготовления жидких инъекционных глазных лекарственных форм.

Имплантат глазной – твердая дозированная лекарственная форма, предназначенная для введения во внутренние структуры глаза на длительный период времени для оказания определенного фармакологического действия.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Глазные лекарственные формы должны быть стерильны. Стерилизацию глазных лекарственных форм проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация».

Осмоляльность глазных лекарственных форм должна находиться в пределах осмоляльности 0,6 – 2,0 % раствора натрия хлорида. Допускается применение гипер- и гипоосмотических капель глазных, но обычно состав капель глазных с концентрацией лекарственных веществ ниже эквивалентной 0,6 % концентрации раствора натрия хлорида, подлежит коррекции путём добавления соответствующих вспомогательных веществ (натрия хлорида, натрия сульфата, натрия нитрата и др.).

Оптимальное значение pH глазных лекарственных форм должно соответствовать pH слезной жидкости – 7,4. Значение pH может отличаться от оптимального, но должно находиться в пределах от 3,5 до 8,5.

Для обеспечения стабильности глазных лекарственных форм в их состав могут входить антиоксиданты: натрия сульфит, натрия метабисульфит, натрия тиосульфат; комплексообразователь: натрия эдетат; консерванты: бензиловый спирт, хлорбутанолгидрат, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, бензалкония хлорид, борная кислота в концентрации 1,9-2,0 %; вещества, регулирующие pH среды: буферные растворы, натрия фосфат одно- и

двузамещенный, натрия цитрат, натрия гидроксид, натрия гидрокарбонат, натрия тетраборат и др.

Увеличение продолжительности действия капель глазных может быть достигнуто повышением их вязкости. Для этого используют гидроксипропилметилцеллюлозу (0,3 – 0,5 %), метилцеллюлозу (0,1 – 0,7 %), поливиниловый спирт (1 – 2 %), натрий карбоксиметилцеллюлозу (1 – 2 %) и другие пролонгаторы, разрешенные для медицинского применения. Оптимальной для капель глазных является вязкость 5 – 15 мм²/с. Показатель вязкости капель глазных может отличаться от оптимальных значений, но, как правило, не должен превышать 150 мм²/с.

Глазные лекарственные формы для местного применения в многодозовых упаковках должны содержать подходящий антимикробный консервант в необходимой концентрации, за исключением тех случаев, когда само действующее вещество обладает достаточным антимикробным действием. Выбранные антимикробные консерванты должны быть совместимы с другими ингредиентами лекарственной формы и сохранять эффективность в течение всего периода её использования.

Инъекционные глазные лекарственные формы и имплантаты глазные должны выпускаться в однодозовых упаковках и не должны содержать консервантов.

Основа для мягких глазных лекарственных форм должна быть стерильной, нейтральной, должна равномерно распределяться на слизистой оболочке глаза и не содержать каких-либо посторонних примесей.

При производстве глазных лекарственных форм, содержащих диспергированные частицы, должны быть предусмотрены меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Все глазные лекарственные формы должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Для всех дозированных глазных лекарственных форм должно прово-

даться определение однородности дозирования в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Во всех глазных лекарственных формах, содержащих антимикробные консерванты и антиоксиданты, проводят оценку их подлинности и количественное определение.

Капли глазные, представленные водными растворами, контролируют по показателям качества: «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Осмоляльность», «Механические включения (видимые)» в соответствии с требованиями соответствующих ОФС.

Капли глазные, представленные масляными растворами, дополнительно контролируют по показателям «Кислотное число» и «Перекисное число» в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число» и ОФС «Перекисное число».

Капли глазные, суспензионного типа контролируют по показателям «рН», «Осмоляльность», «Размер частиц», «Седиментационная устойчивость». Методика определения и нормативные требования по показателям «Размер частиц» и «Седиментационная устойчивость» для капель глазных суспензионного типа приведены в ОФС «Суспензии».

Капли глазные, эмульсионного типа контролируют по показателям «рН», «Осмоляльность», «Размер частиц»;

Капли глазные, представленные растворами высокомолекулярных соединений, анализируют по показателям «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Осмоляльность», «Вязкость», «Механические включения (видимые)».

При наличии в составе капель глазных действующих или вспомогательных веществ, увеличивающих их вязкость, вязкость капель глазных нормируется, и её определение проводится в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость».

Оценка вязкости капель глазных, представленных растворами высокомолекулярных соединений (производных целлюлозы) в концентрации до

10 мг/мл, проводится в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» методом капиллярной вискозиметрии при 20°C.

Требования, предъявляемые к *примочкам глазным* аналогичны требованиям, предъявляемым к каплям глазным, представленным водными растворами.

Мази и гели глазные должны соответствовать требованиям ОФС «Мази».

Мази и гели глазные, гетерогенного и комбинированного типа, должны выдерживать испытание по показателю «Размер частиц».

Пробу, содержащую не менее 10 мкг твердого действующего вещества, осторожно наносят тонким слоем на предметное стекло и просматривают под микроскопом всю площадь образца. Вначале образец просматривают при малом увеличении (например, 50× до 70×), отмечая частицы с максимальным размером более 25 мкм. Затем производят измерения этих частиц при большем увеличении (например, от 200× до 500×). Количество частиц рассчитывают на 10 мкг твердого действующего вещества. Для каждого образца, содержащего 10 мкг твердого действующего вещества, должно быть не более 20 частиц с максимальным размером более 25 мкм, и из них не более 2 частиц с максимальным размером более 50 мкм, не допускается наличия частиц с максимальным размером более 90 мкм.

Мази глазные, упакованные в металлические тубы, дополнительно контролируют по показателю «Металлические частицы». Определение проводят на 10 тубах. Содержимое каждой из 10 туб (мазь максимально выдавливают из туб) помещают в отдельные чистые, без царапин чашки Петри диаметром 60 мм с плоским дном. Чашки Петри закрывают и нагревают при температуре 85 °C в течение 2 ч. При необходимости температуру слегка повышают, чтобы мазь полностью перешла в жидкое состояние. Охлаждают мазь до комнатной температуры и затвердевания, избегая перемешивания и встряхивания. Удаляют крышки и переворачивают каждую чашку Петри на подставку микроскопа с увеличением не менее 30× и диском окуляра микро-

метра, который откалиброван на используемое увеличение. Помимо обычного освещения необходим источник света, направленный на образец мази сверху под углом 45° . Исследуют всю поверхность дна чашки Петри на наличие металлических частиц. Их обнаруживают по металлическому блеску, изменяя интенсивность света от дополнительного источника. Подсчитывают число металлических частиц, любой размер которых составляет 50 мкм или более.

Мазь глазная отвечает требованиям, если общее число таких частиц во всех 10 тубах не превышает 50, и если не более чем в 1 тубе содержится более 8 частиц указанной величины. Если данное требование не выполняется, исследование повторяют на 20 дополнительных тубах. Глазная мазь отвечает требованиям, если общее число металлических частиц, любой размер которых составляет 50 мкм и более, не превышает 150 во всех 30 тубах, и если не более чем в 3 тубах содержится более 8 частиц указанной величины (в каждой из туб).

Для мазей глазных, упакованных в металлические тубы, проводят определение герметичности упаковки в соответствии с требованиями ОФС «Мази». Данный показатель контролируется в процессе производства.

Мази глазные, в состав которых входят вещества, способные к гидролизу и окислению, контролируют по показателям «Кислотное число» и «Перекисное число» в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число» и ОФС «Перекисное число».

Гели глазные, представленные растворами карбомера, должны оцениваться по показателю «Вязкость» в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» методом ротационной вискозиметрии при 25°C .

Пленки глазные из биорастворимых полимеров контролируют по показателям: «Размер пленки», «Однородность дозирования», «Однородность массы», «Время растворения», «Потеря в массе при высушивании». Полученный раствор оценивают по показателям «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «рН», «Механические включения (видимые)» в соответ-

вии с требованиями, предъявляемыми к каплям глазным. При наличии испытания на однородность дозирования определение однородности массы не проводят.

В разделе «Размер пленки» указывают геометрические размеры пленки в мм: длину, толщину, ширину, которые должны быть фиксированы. Размеры пленки определяют путем измерения микрометром.

Для определения времени растворения пленки глазные растворяют в натрия хлорида растворе 0,9 %. Время, в течение которого пленка растворяется, является нормируемой величиной. Обычно пленки растворяются в течение 2 – 3 ч. Если условия растворения и нормативные требования отличаются от приведенных, они должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Потерю в массе при высушивании определяют в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Определение однородности массы пленок глазных проводят по следующей методике: определяют среднюю массу взвешиванием 10 пленок порознь с точностью до 0,001 г. Отклонения от установленной средней массы допустимы в пределах $\pm 10\%$, только одна пленка может превысить предел допустимых отклонений, но не более чем вдвое. В случае превышения допустимых отклонений определение повторяют на 20 пленках, из которых только 2 могут превысить предел допустимых отклонений, но не более чем вдвое.

Если при производстве глазных пленок используются органические растворители, проводят контроль их остаточного содержания в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Для твердых глазных лекарственных форм для приготовления капель глазных необходимо оценивать качество как самой лекарственной формы, так и получаемых из нее капель глазных.

Таблетки для приготовления капель глазных должны соответствовать

требованиям ОФС «Таблетки».

Растворение или суспендирование таблеток должно проводиться в том растворителе или жидкости, которая указана в инструкции по применению лекарственного препарата, при отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Полученный раствор или суспензия контролируются по показателям качества капель глазных.

Порошки для приготовления капель глазных испытывают в соответствии с требованиями ОФС «Порошки».

Порошки для приготовления капель глазных контролируют по показателю «Время растворения/суспендирования».

Дополнительно проводят испытания раствора (суспензии), полученного после растворения (суспендирования) порошка в том растворителе и в той концентрации, которые указаны в инструкции по применению, при отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, по показателям качества капель глазных.

Требования к лиофилизатам для приготовления капель глазных аналогичны требованиям, предъявляемым к порошкам для приготовления капель глазных.

При использовании в производстве порошков и лиофилизатов органических растворителей необходимо контролировать их остаточное содержание в соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Инъекционные глазные лекарственные формы и имплантаты глазные должны отвечать требованиям, предъявляемым к лекарственным формам для парентерального применения, в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Для инъекционных глазных лекарственных форм необходимо контролировать осмоляльность и невидимые механические включения согласно требованиям соответствующих ОФС.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Глаз-

ные лекарственные формы выпускают в стерильных однократных и многократных упаковках с контролем первого вскрытия.

Глазные мази и гели упаковывают в стерильные, сжимаемые, мелкоемкие (если не указано иначе – не более 10 г) тубы со встроенным или приложенным наконечником.

Объем глазной примочки в многократной упаковке должен быть не более 200 мл, если нет других указаний в фармакопейной статье.

Каждую глазную пленку/имплантат перед помещением в блистеры, пеналы и т.д. упаковывают индивидуально.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

На упаковке приводят указание о стерильности лекарственного препарата. Указывают названия действующих веществ, их количества и перечень названий всех вспомогательных веществ.

На упаковке многократных лекарственных форм указывают срок хранения лекарственного препарата после первого вскрытия.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В стерильной упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Гранулы**ОФС.1.4.1.0004.15****Взамен ГФ X, ст. 315,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Гранулы – твердая дозированная или недозированная лекарственная форма в виде крупинок (агрегатов частиц порошка) круглой, цилиндрической или неправильной формы, содержащая одно или несколько действующих веществ с добавлением вспомогательных веществ.

Гранулы предназначены для приема внутрь или для приготовления жидких лекарственных форм для приема внутрь.

Гранулы должны быть однородны по окраске, если нет других указаний в фармакопейных статьях или нормативной документации. Размер гранул должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации в соответствующем разделе.

Гранулы могут выпускаться в однодозовых или многодозовых упаковках.

В зависимости от наличия оболочки различают гранулы без оболочки (гранулы) и гранулы, покрытые оболочкой. По характеру высвобождения действующего вещества различают гранулы с обычным высвобождением и гранулы с модифицированным высвобождением.

Гранулы, покрытые оболочкой, – гранулы, покрытые одним или несколькими слоями, состоящими из смеси различных вспомогательных веществ, предназначенные для приема внутрь.

Гранулы с модифицированным высвобождением действующего вещества – гранулы, покрытые специальными оболочками или содержащие

специальные вещества, или приготовленные с использованием специальной технологии, позволяющей регулировать скорость и/или время и/или место высвобождения действующего вещества, предназначенные для приема внутрь. Среди гранул с модифицированным высвобождением различают гранулы с пролонгированным и отсроченным высвобождением.

Гранулы кишечнорастворимые – гранулы, устойчивые к действию желудочного сока и высвобождающие действующее вещество под действием кишечного сока, что обеспечивается покрытием гранул соответствующим материалом или иным способом.

Гранулы для приготовления жидких лекарственных форм для приема внутрь – гранулы, предназначенные для получения растворов или суспензий для приема внутрь, которые получают путем их растворения или диспергирования в соответствующем растворителе.

Гранулы шипучие – гранулы, в состав которых введены вещества кислотного и основного характера (карбонаты или гидрокарбонаты), которые в присутствии воды разлагаются с выделением углерода диоксида. Гранулы шипучие предназначены для растворения в воде перед приемом внутрь. В состав гранул шипучих могут быть введены корригенты вкуса, стабилизаторы, консерванты, красители.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Гранулы, покрытые оболочкой, получают последовательным нанесением слоев пленкообразующего покрытия на частицы носителя любым подходящим способом.

При получении, упаковке и хранении гранул должны быть предприняты соответствующие меры, обеспечивающие необходимую микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Указывают форму, цвет, наличие оболочки.

Размер гранул. Размер гранул должен быть в пределах от 0,2 до 3 мм.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Ситовой анализ».

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании». Норму указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» с использованием навески препарата 0,5 г и сетки (и при необходимости дисков) с отверстиями размером 0,5 мм. При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации в качестве жидкой среды используют воду.

Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, *гранулы* должны распадаться в течение 15 мин, *гранулы, покрытые оболочкой*, должны распадаться в течение 30 мин.

Для *гранул кишечнорастворимых*, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят со следующими изменениями в два этапа. В качестве жидкой среды на первом этапе используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М. Время устойчивости гранул в кислой среде может зависеть от их состава, но не должно быть менее 1 ч и превышать 3 ч. Гранулы не должны распадаться и обнаруживать признаки растрескивания и размягчения. На втором этапе кислоту заменяют фосфатным буферным раствором pH 6,8. Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то в буферном растворе гранулы должны распадаться в течение 1 ч.

Для *шипучих гранул* испытание проводят по следующей методике. В стакан, содержащий 200 мл воды, помещают одну дозу гранул; наблюдается интенсивное выделение пузырьков газа. Гранулы считаются распавшимися, если после прекращения выделения газа они или растворились, или диспергировались в воде. Испытание повторяют еще на 5 дозах. Гранулы выдерживают испытание, если каждая из 6 доз растворяется в течение не более 5 мин.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с ОФС

«Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», за исключением гранул, время распадаемости которых не превышает 5 мин. Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено определение растворения, испытание на распадаемость не является обязательным.

Гранулы в однократной упаковке должны выдерживать испытание по показателю **«Однородность дозирования»** в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Если в состав гранул входят летучие вещества или вещества, требующие защиты от воздействия воздуха, упаковка должна быть воздухонепроницаемой. Шипучие гранулы хранят в упаковке, обеспечивающей защиту от проникновения влаги.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капсулы**ОФС.1.4.1.0005.15****Взамен ГФ X, ст. 130,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Капсулы представляют собой дозированную лекарственную форму, содержащую одно или несколько действующих веществ различной консистенции, с добавлением или без вспомогательных веществ, заключенных в твердую или мягкую оболочку.

По способу применения капсулы делят на капсулы вагинальные, капсулы ректальные, капсулы для приема внутрь, капсулы для рассасывания, капсулы подъязычные, капсулы с порошком для ингаляций.

Разновидностью капсул являются пеллеты.

По консистенции капсулы делятся на твердые и мягкие.

Твердые капсулы – капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами, состоящие из двух частей – корпуса и крышечки, которые входят одна в другую, не образуя зазоров. Корпус и крышечка могут иметь специальные канавки и выступы для обеспечения «замка».

В зависимости от вместимости твердые капсулы могут быть восьми размеров (таблица).

Таблица – Размеры твердых капсул в зависимости от их вместимости

Размер	000	00	0	1	2	3	4	5
Вместимость, мл	1,37	0,95	0,68	0,50	0,37	0,30	0,21	0,13

Допускается использовать капсулы размера 0el (вместимость 0,78 мл), представляющие собой удлиненные капсулы размера 0 («el» – сокращение от англ. «elongated» – удлиненный).

Мягкие капсулы – цельные капсулы различной формы: сферической, цилиндрической, яйцевидной (ректальные или вагинальные), продолговатой или цилиндрической с полусферическими концами, со швом или без шва. Мягкие капсулы имеют более толстую оболочку, чем твердые. Капсулы могут быть различных размеров, вместимостью до 1,5 мл. Эластичность оболочки мягких капсул зависит от содержания пластификаторов.

По характеру высвобождения действующего вещества капсулы делят на капсулы с обычным высвобождением (капсулы) и капсулы с модифицированным высвобождением.

Капсулы с модифицированным высвобождением действующего вещества представляют собой твердые или мягкие капсулы, полученные по особой технологии, или в состав оболочки и/или содержимого которых входят специальные вспомогательные вещества, которые позволяют регулировать время и/или место высвобождения действующего вещества. Среди капсул с модифицированным высвобождением действующего вещества различают капсулы с пролонгированным высвобождением, капсулы с отсроченным высвобождением.

Капсулы кишечнорастворимые – капсулы, покрытые оболочкой, устойчивой к действию желудочного сока, или полученные с использованием веществ, устойчивых к воздействию желудочного сока, или капсулы, представляющие собой твердые капсулы, наполненные гранулами, микрокапсулами или другими частицами, покрытыми кислотоустойчивой оболочкой. Содержимое кишечнорастворимых капсул высвобождается в верхнем отделе кишечника.

Пеллеты – покрытые оболочкой твердые частицы шарообразной формы, содержащие одно или несколько действующих веществ различной консистенции с добавлением или без вспомогательных веществ, обычно имеющие размеры от 2000 до 5000 мкм.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Твердые капсулы получают внесением содержимого капсулы (преиму-

щественно в твердой форме, например, порошок или гранулы) в корпус капсулы.

Мягкие капсулы формуют, наполняют и запаивают в ходе одной технологической операции. Содержимое мягких капсул может быть жидким или пастообразным. Твердые вещества обычно растворяют или диспергируют в подходящем носителе, разрешенном к медицинскому применению.

Для получения капсульной оболочки используют желатин, другие полимерные структурообразователи и вспомогательные вещества: непрозрачные наполнители, поверхностно-активные вещества, консерванты, красители, корригенты вкуса, ароматизаторы и другие вещества, разрешенные к медицинскому применению.

В качестве вспомогательных веществ могут использоваться растворители, разбавители, эмульгаторы, смазывающие, разрыхляющие вещества и другие. Содержимое капсул не должно разрушать оболочку. Оболочка должна разрушаться в месте действия с высвобождением действующего вещества (веществ).

Оболочка капсулы должна иметь гладкую поверхность и не должна содержать воздушных пузырьков или механических повреждений. На поверхность капсул может быть нанесена маркировка.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Твердые и мягкие капсулы. Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, капсулы должны распадаться в воде за 30 мин. В качестве жидкой среды допускается использовать хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М или искусственный желудочный сок. Если капсулы плавают на поверхности жидкости, следует использовать диски.

Кишечнорастворимые капсулы. Испытание распадаемости кишечнорастворимых капсул проводят в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М в течение 2 ч, не используя диски. Кишечнорастворимые капсулы должны ос-

таваться неповрежденными в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, но не менее 1 ч. Повреждением капсулы считается любое нарушение целостности стенки капсулы, позволяющее содержимому капсулы выйти в окружающую среду. Затем капсулы помещают в фосфатный буферный раствор со значением рН 6,8, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, и подвергают воздействию в течение 1 ч, используя диски.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Если проводят испытание по показателю «Растворение», то допускается испытание по показателю «Распадаемость» не проводить.

Капсулы должны выдерживать испытания на **однородность дозирования** и **однородность массы** согласно требованиям соответствующих ОФС.

УПАКОВКА

В соответствии с ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные формы для ингаляций – жидкие или твердые лекарственные формы, предназначенные для введения в легкие действующего вещества (веществ) в виде паров или дисперсий твердых или жидких частиц в газовой среде с целью получения местного или системного эффекта.

Лекарственные формы для ингаляций содержат одно или более действующих веществ, которые растворяют или диспергируют в соответствующем носителе.

Лекарственные формы для ингаляций могут быть дозированными и не дозированными.

Доза – количество действующего вещества, которое должно быть принято за один раз, указанное в инструкции по медицинскому применению. Для получения одной дозы может потребоваться несколько высвобождений.

Высвобождение – приведение в действие устройства распыления/доставки лекарственного средства.

Доставляемая доза – количество действующего вещества, которое фактически получает пациент (не учитывается количество действующего вещества, осевшее на составных частях ингалятора).

Респирабельная фракция – количество действующего вещества, предположительно проникающее в легкие во время ингаляции (частицы с диаметром приблизительно от 1 до 5 мкм).

Различают твердые (порошки) и жидкие лекарственные формы для ингаляций. К жидким лекарственным формам относят три категории препаратов:

А. Лекарственные формы, предназначенные для ингаляций в парообразном состоянии (к этой категории также можно условно отнести твердые лекарственные формы, предназначенные для растворения или диспергирования в жидкой среде перед применением). Данные препараты представляют собой растворы, суспензии, эмульсии или твердые лекарственные формы. Как правило, их добавляют в горячую воду и образующийся пар вдыхают.

Б. Жидкие лекарственные формы для распыления с помощью небулайзера, которые представляют собой растворы, суспензии или эмульсии. К этой категории также можно условно отнести твердые лекарственные формы, предназначенные для растворения или диспергирования в жидкой среде перед применением. Препараты для распыления выпускают в многодозовых или однодозовых упаковках.

Небулайзер – ингалятор, обеспечивающий преобразование жидкого лекарственного средства для распыления в дисперсию в газовой среде при помощи, как правило, электрической энергии. Различают компрессорные, ультразвуковые небулайзеры, либо иного типа. Небулайзеры должны обеспечивать образование дисперсных частиц подходящего размера для доставки действующего вещества в легкие. Препараты, предназначенные для распыления с помощью небулайзеров, могут быть приготовлены из концентрированных лекарственных форм или порошков с помощью разбавителя, указанного в инструкции по медицинскому применению.

В. Лекарственные формы для ингаляций, находящиеся под давлением в упаковке с дозирующей клапанно-распылительной системой (аэрозоли и спреи). Аэрозоли и спреи представляют собой растворы, суспензии или эмульсии.

Порошки для ингаляций содержат одну или несколько доз порошка.

Порошки применяют при помощи порошковых ингаляторов, приспособленных для использования с однократными капсулами, блистерами или иными подходящими формами, содержащими порошок для ингаляций, либо имеющих резервуар для порошка. В последнем случае доза отмеряется с помощью дозирующего устройства ингалятора.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Препараты для ингаляций в зависимости от типа лекарственной формы и природы субстанции могут содержать пропелленты (тетрафторэтан и др.), растворители (вода, этанол и др.), антимикробные консерванты (метилпарагидроксибензоат и др.), поверхностно-активные вещества (полисорбат-20 и др.), стабилизирующие агенты (натрия эдетат и др.) и т.д. Вспомогательные вещества в используемых концентрациях не должны отрицательно влиять на основное терапевтическое действие лекарственного препарата, не должны быть токсичными и не должны неблагоприятно воздействовать на функции слизистой оболочки дыхательных путей и ее реснитчатого эпителия.

При разработке лекарственных форм для ингаляций, содержащих антимикробные консерванты, необходимость их применения и эффективность должны быть доказаны.

Состав лекарственных форм для ингаляций и процесс их производства должны обеспечивать однородность дозирования и респираторность (доставляемость в легкие) действующего вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Жидкие лекарственные формы, предназначенные для ингаляций в парообразном состоянии, а также для распыления с помощью небулайзера, представляющие собой суспензии или эмульсии, должны соответствовать требованиям ОФС «Суспензии» или ОФС «Эмульсии».

Препараты для ингаляций, находящиеся под давлением, должны соответствовать требованиям ОФС «Аэрозоли и спреи».

Порошки для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС

«Порошки».

pH. Испытание проводят для жидких лекарственных форм, предназначенных для ингаляций в парообразном состоянии, а также для распыления с помощью небулайзера. Если не указано иначе, значение pH данных препаратов или их растворов (дисперсий) должно составлять не менее 3,0 и не более 8,5.

Механические включения. Испытание проводят для аэрозолей и порошков для ингаляций. 50 доз препарата пропускают через фильтр (методика приводится в фармакопейной статье или нормативной документации), который затем рассматривают под микроскопом, снабженным подходящим окуляром. Определяют количество частиц с диаметром более 100 мкм, также учитывают фоновое загрязнение реактивов (проводят контрольный опыт). Если не указано иначе, допускается наличие не более 50 частиц диаметром 100 мкм и более в 50 дозах. Отсутствие данного показателя должно быть обосновано.

Количество доз. Проводится для лекарственных форм для ингаляций, снабженных дозирующим устройством, одновременно с испытанием «Однородность доставляемой дозы». Количество доз должно быть не менее номинального значения.

Респирабельная фракция. Испытание проводят для аэрозолей для ингаляций и порошков для ингаляций, а также жидких лекарственных форм для распыления, снабженных индивидуальными небулайзерами. Используют приборы и методики, описанные в ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц». Нормы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность доставляемой дозы (однородность дозирования). Испытание проводят для дозированных лекарственных форм для ингаляций. Контроль данного показателя для препаратов в упаковках с дозирующим устройством должен проводиться не только для доз, высвобождаемых из одной упаковки, но и для доз, полученных из разных упаковок. Процедура

отбора доз при оценке однородности дозирования из разных упаковок приводится в фармакопейной статье или нормативной документации и должна включать в себя отбор доз в начале, в середине и в конце использования ингалятора.

Методика для аэрозолей

Высвобождение дозы проводят в соответствии со способом, описанным в инструкции по применению или в фармакопейной статье или нормативной документации; как правило, ингалятор используют в перевернутом состоянии.

Для сбора дозы используют следующий прибор и методику.

Прибор (рис. 1) состоит из держателя фильтра (А), цилиндра для сбора образцов (Б), который герметично закрепляется с держателем фильтра и адаптером (В), соединяющим цилиндр для сбора образцов и выходное отверстие ингалятора. Держатель фильтра сконструирован для использования фильтров диаметром 25 мм. Вакуумный ниппель соединяет насос и регулятор воздушного потока. Воздушный поток регулируют таким образом, чтобы воздух проходил через всю конструкцию, включая фильтр и ингалятор, со скоростью $28,3 \pm 1,5$ л/мин. Фильтр и другие составляющие части конструкции должны быть совместимы с компонентами лекарственной формы и растворителями, которые используются для извлечения действующего вещества из фильтра. В собранном виде все соединения прибора должны быть герметичны.

Испытание проводят, по отдельности определяя количество действующего вещества в 10 дозах. При отсутствии иных указаний в инструкции по медицинскому применению перед использованием упаковку встряхивают в течение 5 с и отбрасывают одну дозу. При включенном насосе вставляют ингалятор в прибор и выпускают одну дозу, через 5 с насос отключают. Производят смывы с фильтра и внутренней поверхности собирательного цилиндра, используя определенные порции растворителя в соответствии с методикой, приведенной в фармакопейной статье или

нормативной документации. Процедуру повторяют дополнительно 2 раза.

Необходимое количество доз отбрасывают с интервалом не менее 5 с до тех пор, пока не останется $(n/2)+1$ доза, где n – заявленное количество доз. Собирают 4 дозы согласно описанной выше методике.

Снова отбрасывают необходимое количество доз с интервалом не менее 5 с до тех пор, пока не останется 3 дозы. Собирают 3 последние дозы согласно описанной выше методике.

Определяют количество действующего вещества в каждой собранной порции по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для лекарственных форм, содержащих более одного действующего вещества, проводят определение для каждого действующего вещества.

В случае, если содержимое упаковки представляет собой раствор, допускается производить оценку однородности доставляемой дозы путем определения средней массы одной дозы и отклонений от средней массы.

Лекарственная форма выдерживает испытание, если 9 из 10 результатов находятся в пределах от 75 до 125 % от среднего значения, а все результаты находятся в пределах от 65 до 135 %. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75 – 125 %, испытание повторяют с двумя другими ингаляторами. Не более 3 из 30 значений могут выходить за пределы 75 – 125 %, и все значения должны быть в пределах от 65 до 135 %.

Методика для порошков для ингаляций

Высвобождение дозы проводят в соответствии со способом, описанным в инструкции по применению. Прибор для сбора дозы аналогичен прибору, представленному на рис. 1, однако имеет больший диаметр. Для испытания собирают прибор, представленный на рис. 2 и описанный в таблице. Размеры фильтров и трубок должны быть приемлемы для используемой скорости потока.

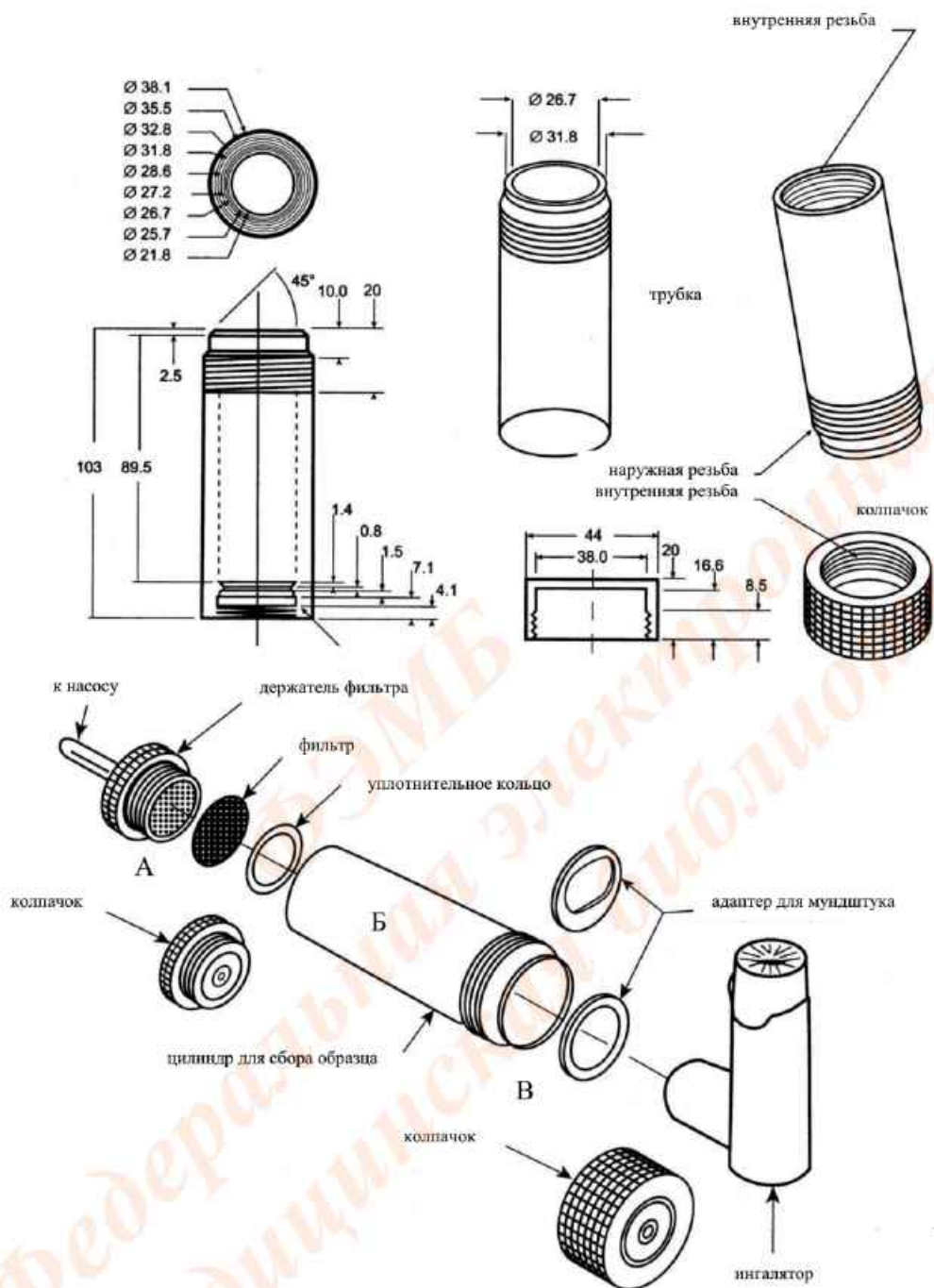


Рис. 1 – Прибор для сбора дозы в дозированных лекарственных формах, находящихся под давлением. Размеры приведены в мм

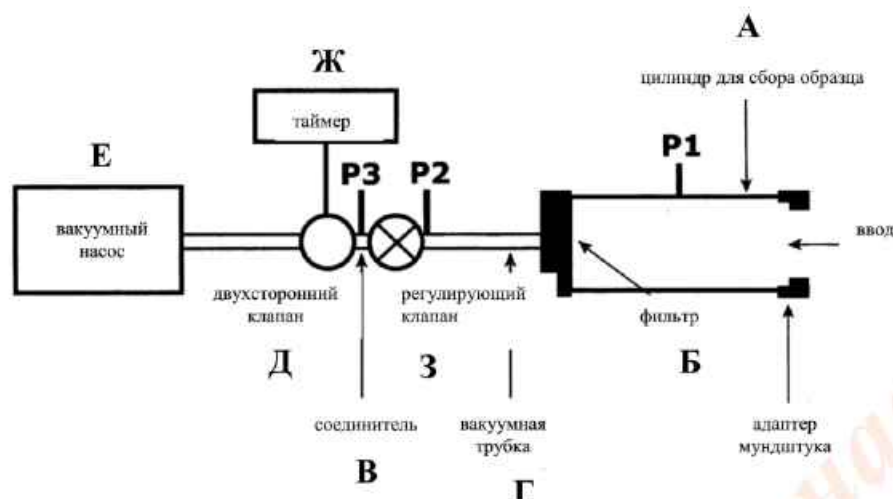


Рис. 2 – Прибор для определения однородности дозирования в порошковых ингаляторах

Таблица – Описание элементов прибора, предназначенного для определения однородности дозирования в порошковых ингаляторах

Код	Элемент прибора	Описание
А	Цилиндр для сбора образца	Количественный отбор действующего вещества. Аналогичен цилиндру на рис. 1 с размерами 34,85 мм (внутренний диаметр) x 12 см (длина)
Б	Фильтр	47 мм фильтр, например, стеклянный волокнистый фильтр
В	Соединитель	Внутренний диаметр ≥ 8 мм, например, короткая металлическая муфта с отводом к P3 меньшего диаметра
Г	Вакуумная трубка	Трубка $\geq (8 \pm 0,5)$ мм (внутренний диаметр), достаточной длины для внутреннего объема (25 ± 5) мл, например, силиконовая
Д	Двухсторонний клапан	Двухсторонний, двухпортовый электромагнитный клапан, имеющий минимальное сопротивление воздушному потоку, с внутренним диаметром ≥ 8 мм и временем реакции ≤ 100 мс
Е	Вакуумный насос	Насос должен обеспечивать достаточную скорость воздушного потока через собранную систему. Насос соединяют с двухсторонним клапаном с помощью вакуумной трубки (внутренний диаметр ≥ 10 мм)
Ж	Таймер	Таймер, способный регулировать двухсторонний клапан в течение необходимого времени
P1	Отвод к манометру	2,2 мм (внутренний диаметр), 3,1 мм (наружный диаметр), контактирует с внутренней поверхностью цилиндра для сбора образца. Отвод к манометру не должен открываться в атмосферу
P2 P3	Измерители давления	Измерители абсолютного давления
З	Регулирующий клапан	Клапан, регулирующий воздушный поток с максимальным значением $C_v \geq 1$

Определяют скорость потока и длительность отбора образца с помощью цилиндра для сбора образца по следующей процедуре.

Ингалятор готовят согласно инструкции по применению и герметично соединяют его с цилиндром для сбора образца при помощи адаптера. Соединяют одно отверстие манометра с отводом (P1), второе отверстие манометра оставляют открытым. Включают насос, открывают двухсторонний клапан (Д). С помощью регулирующего клапана (З) устанавливают давление величиной 4,0 кПа (40,8 см H₂O). Отсоединяют ингалятор от адаптера и, не изменяя положение регулирующего клапана (З), присоединяют измеритель скорости потока к входному отверстию системы. Для измерения скорости исходящего потока используют либо измеритель скорости потока, откалиброванный для потока, исходящего из измерительного прибора, либо, в случае использования прибора, откалиброванного на измерение входящего потока ($Q_{вх}$), рассчитывают скорость исходящего потока ($Q_{исх}$) по закону идеального газа:

$$Q_{исх} = \frac{Q_{вх} \cdot P_0}{P_0 - \Delta P},$$

где P_0 – атмосферное давление, мм рт.ст;

ΔP – перепад давления в измерительном приборе, мм рт.ст.

В случае если скорость потока превышает 100 л/мин, с помощью регулирующего клапана (З) устанавливают данный показатель в пределах (100 ± 5) л/мин. Отмечают скорость потока, выходящего из измерителя, и определяют время, в течение которого 4 л воздуха проходят через ингалятор.

При присоединенном адаптере измеряют абсолютное давление с обеих сторон регулирующего клапана (точки замера P2 и P3, рис. 2). Соотношение P3/P2 должно составлять $\leq 0,5$, в противном случае производят увеличение мощности насоса и повторяют измерения.

Для порошковых ингаляторов, приспособленных для использования с капсулами, подготавливают ингалятор в соответствии с инструкцией по применению, герметично подсоединяют к прибору. Пропускают 4 л воздуха

через прибор. Отсоединяют ингалятор. Производят смывы с фильтра и внутренней поверхности собирательного цилиндра, используя определенные порции растворителя в соответствии с методикой, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации. Повторяют процедуру 9 раз. Определяют количество действующего вещества в каждой собранной порции по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Ингаляторы, имеющие резервуар, подготавливают в соответствии с инструкцией по применению, герметично подсоединяют к прибору. Пропускают 4 л воздуха через прибор. Отсоединяют ингалятор. Производят смывы с фильтра и внутренней поверхности собирательного цилиндра, используя определенные порции растворителя в соответствии с методикой, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации. Повторяют процедуру 2 раза.

Необходимое количество доз отбрасывают до тех пор, пока не останется $(n/2)+1$ доза, где n – заявленное количество доз. Собирают 4 дозы согласно описанной выше методике.

Снова отбрасывают необходимое количество доз до тех пор, пока не останется 3 дозы. Собирают 3 последние дозы согласно описанной выше методике.

Определяют количество действующего вещества в каждой собранной порции по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для лекарственных форм, содержащих более одного действующего вещества, проводят определение для каждого действующего вещества.

Препарат выдерживает испытание, если 9 из 10 результатов находятся в пределах от 75 до 125 % от среднего значения, а все результаты находятся в пределах от 65 до 135 %. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75 – 125 %, испытание повторяют с двумя другими ингаляторами. Не более 3 из 30 значений могут выходить за пределы 75 – 125 %, и все значения должны

быть в пределах от 65 до 135 %.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Лекарственные формы для ингаляций выпускают в многодозовых или однодозовых упаковках. Многодозовые упаковки должны быть снабжены дозирующим устройством, за исключением лекарственных форм, предназначенных для распыления с помощью небулайзеров. Материалы, из которых изготовлены упаковки и дозирующие устройства, должны быть инертны по отношению к компонентам лекарственного средства.

На упаковках должны отсутствовать внешние повреждения, наружная коррозия, протечки.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На упаковке указывают названия всех вспомогательных компонентов, входящих в состав лекарственной формы, условия хранения и предупредительные надписи, предусмотренные в фармакопейных статьях или нормативной документации. Для дозированных лекарственных форм указывают количество доз в упаковке. В случаях, если для получения рекомендуемой дозы требуется более одного высвобождения, указывают необходимое число высвобождений.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

**Лекарственные формы для
парентерального применения**

ОФС.1.4.1.0007.15

**Взамен ст. ГФ XI «Инъекционные
лекарственные формы»**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на иммунобиологические лекарственные препараты, препараты крови человека и радиофармацевтические препараты, предназначенные для парентерального применения.

Растворы для инъекций гомеопатические должны дополнительно выдерживать требования ОФС «Растворы для инъекций гомеопатические».

Лекарственные формы для парентерального применения представляют собой стерильные лекарственные формы, предназначенные для введения в организм человека путем инъекций, инфузий или имплантации (с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт).

К лекарственным формам для парентерального применения относятся:

- инъекционные и инфузионные лекарственные формы (раствор для инъекций, эмульсия для инъекций, суспензия для инъекций, раствор для инфузий, эмульсия для инфузий);
- концентраты для приготовления инъекционных и инфузионных лекарственных форм;
- твердые лекарственные формы, предназначенные для приготовления инъекционных и инфузионных лекарственных форм (порошок; лиофилизат, в том числе «лиофилизированный порошок»);
- лекарственные формы для имплантации (имплантат, таблетка для имплантации и т.д.).

Раствор для инъекций (в том числе «гель для инъекций») – водный или неводный раствор лекарственного вещества/веществ в соответствующем растворителе, предназначенный для инъекционного введения.

Эмульсия для инъекций – эмульсия типа «масло в воде» или «вода в масле», предназначенная для инъекционного введения.

Суспензия для инъекций – суспензия, предназначенная для инъекционного введения.

В зависимости от способа введения инъекционные лекарственные формы подразделяются на подкожные, внутримышечные, внутривенные, внутрисуставные, внутрисердечные, внутриполостные, субконъюнктивальные и др.

Раствор для инфузий – водный раствор для внутрисосудистого введения объёмом 100 мл и более.

Эмульсия для инфузий – эмульсия для внутрисосудистого введения типа «масло в воде» объёмом 100 мл и более.

Концентрат для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм – жидкая лекарственная форма, из которой путем разведения соответствующим растворителем получают инъекционную или инфузионную лекарственную форму.

Порошок для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм – твёрдая дозированная лекарственная форма с добавлением или без вспомогательных веществ, обладающая свойством сыпучести, предназначенная для приготовления раствора или суспензии для парентерального применения.

Лиофилизат (в т.ч. «лиофилизированный порошок») для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм – твёрдая дозированная лекарственная форма, полученная методом лиофилизации, предназначенная для приготовления раствора или суспензии для парентерального применения.

Лекарственные формы для имплантации – лекарственные формы, предназначенные для имплантации и высвобождающие лекарственное вещество (вещества) в течение определенного (длительного) периода времени.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Лекарственные формы для парентерального применения подвергают стерилизации в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация» и указаниями фармакопейных статей.

Растворители

Вода, используемая при производстве лекарственных форм для парентерального применения, должна соответствовать требованиям ФС «Вода для инъекций».

В качестве водных растворителей, кроме воды для инъекций, можно использовать изотонический раствор натрия хлорида, раствор Рингера, раствор глюкозы 5 % и др., неводных – жирные растительные масла или другие органические растворители.

Если не указано иначе в фармакопейной статье, растительные масла, предназначенные для приготовления лекарственных форм для парентерального применения, должны соответствовать следующим требованиям: быть прозрачными при температуре 10 °С, без запаха или почти без запаха и не иметь запаха прогорклости. Кислотное число должно быть не более 0,56, число омыления должно быть от 185 до 200, йодное число от 79 до 141. Могут использоваться также жидкие синтетические моно- и диглицериды жирных кислот, которые должны быть прозрачны при охлаждении до 10 °С и иметь йодное число не превышающее 140.

В составе комплексных растворителей могут быть использованы спирт этиловый, глицерин, пропиленгликоль, макрогол 400, бензилбензоат, бензиловый спирт и другие.

Растворители, используемые для получения лекарственных форм для парентерального применения, должны отвечать требованиям фармакопейных

статей по показателям «Бактериальные эндотоксины» или «Пирогенность».

Вспомогательные вещества

В состав лекарственных форм для парентерального применения могут быть добавлены антимикробные консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, солюбилизаторы и другие вспомогательные вещества, указанные в фармакопейных статьях.

В качестве вспомогательных веществ, повышающих стабильность действующих веществ, используют аскорбиновую, хлористоводородную, винную, лимонную, уксусную кислоты, натрия карбонат и гидрокарбонат, натрия гидроксид, калия или натрия сульфит, натрия гидросульфит или метабисульфит, натрия тиосульфат, динатрия эдетат, натрия цитрат, натрия фосфат одно- или двузамещенные, антимикробные консерванты – метилпарагидроксибензоат и пропилпарагидроксибензоат, хлорбутанол, крезол, фенол и другие.

Количество используемых вспомогательных веществ, если нет других указаний в фармакопейной статье, не должно превышать следующих концентраций: для веществ, содержащих ртуть и катионные поверхностно-активные вещества – 0,01 %; для веществ, подобных хлорбутанолу, крезолу и фенолу – 0,5 %; для сернистого ангидрида или эквивалентных количеств сульфита, бисульфита и метабисульфита калия или натрия – 0,2 %.

В многодозовые лекарственные формы для парентерального применения консерванты добавляют независимо от способа стерилизации, за исключением тех случаев, когда само лекарственное вещество обладает антимикробной активностью.

Лекарственные формы для парентерального применения при разовой дозе, превышающей 15 мл, за исключением специальных случаев, а также лекарственные формы для внутримышечных, внутрисердечных, внутриглазных инъекций или инъекций, имеющих доступ к спинномозговой жидкости, не должны содержать антимикробных консервантов.

Инфузионные лекарственные формы обычно должны быть изотоничны по отношению к крови человека и не должны содержать антимикробных консервантов.

ИСПЫТАНИЯ

Все лекарственные формы для парентерального применения должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Лекарственные формы для парентерального применения, а также фармацевтические субстанции, используемые для их приготовления, подвергают испытанию на бактериальные эндотоксины или пирогены. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» или ОФС «Пирогенность».

Для лекарственных форм для парентерального применения, приготовленных из сырья природного происхождения, для инъекционных и инфузионных лекарственных форм в упаковках из полимерных материалов и в других случаях, если это указано в фармакопейной статье, проводят испытание на аномальную токсичность в соответствии с требованиями ОФС «Аномальная токсичность».

Лекарственные формы для парентерального применения, предназначенные для внутрисосудистого введения и полученные из фармацевтических субстанций, которые могут обладать депрессорным действием (субстанции микробиологического или животного происхождения), подвергаются испытаниям на гистамин и/или депрессорное действие в соответствии с ОФС «Испытание на гистамин» и «Испытание на депрессорные вещества».

В жидких лекарственных формах для парентерального применения контролируют показатель «рН» в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия».

В лекарственных формах для парентерального применения, содержащих антимикробные консерванты и антиоксиданты, необходимо проводить

определение их подлинности и количественное определение с обязательным указанием верхнего и нижнего пределов содержания.

Лекарственные формы для парентерального применения должны выдерживать испытания по показателю «Механические включения», контролируемые в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения» и ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

ИНЪЕКЦИОННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

Растворы для инъекций (в том числе «гели для инъекций») дополнительно проверяют по показателям: «Прозрачность», «Цветность».

Растворы для инъекций должны быть прозрачными (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»). Цветность растворов для инъекций определяют путем сравнения с эталонами в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» или в соответствии с указаниями фармакопейных статей.

Вязкие растворы для инъекций и растворы ВМС (в том числе «гели для инъекций») дополнительно контролируют по показателю «Вязкость».

Масляные растворы для инъекций дополнительно контролируют по показателю «Плотность».

Эмульсии для инъекций не должны обнаруживать признаков фазового расслоения, должны представлять собой эмульсии типа «масло в воде» и соответствовать требованиям ОФС «Эмульсии». Кроме того, эмульсии для внутрисосудистого введения дополнительно контролируют по показателю «Размер частиц». Если не указано иначе в фармакопейной статье, размер частиц не должен превышать 5 мкм.

Суспензии для инъекций должны отвечать требованиям ОФС «Суспензии».

Суспензии для инъекций дополнительно контролируют по показателям «Размер частиц», «Проходимость через иглу», «Седиментационная устойчи-

вость».

ИНФУЗИОННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

Инфузионные лекарственные формы должны отвечать требованиям, предъявляемым к растворам или эмульсиям для инъекций.

На этикетках инфузионных лекарственных препаратов приводят значение теоретической осмолярности. В случае, если теоретическая осмолярность не может быть рассчитана, указывают среднее значение осмолярности в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Если не указано иначе в фармакопейной статье, для инфузионных лекарственных форм проводят испытание на наличие бактериальных эндотоксинов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины».

КОНЦЕНТРАТЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННЫХ ИЛИ ИНФУЗИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Концентраты перед применением разводят до указанного объема соответствующим стерильным растворителем. После разведения полученный раствор должен соответствовать требованиям, предъявляемым к инъекционным или инфузионным лекарственным формам.

Испытания по показателям «Прозрачность», «Цветность» и «рН» для концентратов проводят на разведенном растворе в том растворителе и в той концентрации, которые указаны в инструкции по применению, если нет других указаний в фармакопейной статье.

ПОРОШКИ И ЛИОФИЛИЗАТЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННЫХ ИЛИ ИНФУЗИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм содержимое упаковки с лекарственным препаратом растворяют или диспергируют в подходящем стерильном растворителе непосредственно перед введением. Полученные растворы или суспензии должны соответствовать всем требованиям, предъявляемым к растворам для инъекций или суспензиям для инъекций.

Испытания по показателям «Прозрачность», «Цветность», «рН» и «Ме-

ханические включения» проводят с использованием раствора, полученного при растворении лекарственной формы в том растворителе и в той концентрации, которые указаны в инструкции по применению, если нет других указаний в фармакопейной статье.

При использовании в производстве порошков или лиофилизатов органических растворителей необходимо контролировать их остаточное содержание в соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Порошки и лиофилизаты для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм должны отвечать требованиям ОФС «Порошки».

ИМПЛАНТАТЫ

Имплантаты контролируют на соответствие требованиям ОФС «Однородность дозирования» и ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Кроме того, необходимо определять размер имплантатов и проводить испытание на высвобождение действующего вещества (веществ).

При наличии испытания на однородность дозирования испытание на однородность массы является не обязательным.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Лекарственные формы для парентерального применения выпускают во флаконах, ампулах, шприцах, картриджах или полимерной упаковке. Упаковки должны быть изготовлены из достаточно прозрачных материалов, позволяющих проводить визуальный контроль содержимого, за исключением упаковки для имплантатов и других случаев, описанных в фармакопейных статьях.

Марка стекла и укупорочных средств должны быть указаны в фармакопейной статье. Материалы, которые используются при производстве упаковок и укупорочных средств, не должны обладать токсическим действием.

Упаковка и укупорочные средства должны обеспечивать герметичность лекарственных форм для парентерального применения, быть химиче-

ски и физически индифферентными по отношению к лекарственному средству, сохранять его терапевтическую активность, качество и чистоту в процессе приготовления, хранения, транспортирования, реализации и использования.

Пластиковые материалы или эластомеры, используемые при производстве укупорочных средств, должны быть достаточно плотными и эластичными, чтобы при прохождении иглы сохранялась целостность пробки и обеспечивалась герметичность упаковки после удаления иглы.

Лекарственные формы для парентерального применения могут выпускаться в однократных упаковках (ампулы, картриджи или заполненные шприцы) или в многократных, содержащих несколько доз действующего вещества.

Объем лекарственной формы для парентерального применения в однократной упаковке должен быть достаточным для однократного введения, но не должен превышать 1 л. Лекарственные формы для парентерального применения, предназначенные для орошения, гемофильтрации, диализа или парентерального питания, освобождаются от указанного ограничения по объему.

Лекарственные формы для парентерального применения, предназначенные для внутримышечных, внутрисердечных, внутриглазных инъекций или инъекций, имеющих доступ к спинномозговой жидкости, должны выпускаться только в однократных упаковках.

Имплантаты и таблетки для имплантации упаковывают в индивидуальные стерильные упаковки.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На упаковке лекарственных форм для парентерального применения указывают название действующих веществ и их количества, перечень названий всех вспомогательных веществ, для инфузионных растворов – дополнительно количе-

ства вспомогательных веществ. При использовании антимикробных консервантов для всех лекарственных форм для парентерального применения указывают концентрацию каждого антимикробного консерванта.

Для инфузионных растворов указывают осмолярность, при указании в фармакопейной статье – дополнительно ионный состав в ммоль/л.

Если к порошку, порошку лиофилизированному или лиофилизату, предназначенному для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм прилагается упаковка с растворителем, на этикетке упаковки должен быть указан состав растворителя.

На упаковке концентратов для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм дополнительно должно быть указано, что раствор разводят перед использованием в соответствии с инструкцией по применению.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Хранение лекарственных средств». В стерильной упаковке, обеспечивающей стабильность лекарственной формы для парентерального применения в течение указанного срока годности, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье.

Мази**ОФС.1.4.1.0008.15****Взамен ГФ X, ст. 709,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Мази – мягкая лекарственная форма, предназначенная для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки.

По типу дисперсных систем различают мази гомогенные (сплавы, растворы), гетерогенные (суспензионные, эмульсионные) и комбинированные.

По консистенции мази подразделяются на собственно мази, кремы, гели, пасты, линименты.

Мази – собственно мази – мягкая лекарственная форма, состоящая из основы и равномерно распределенных в ней действующих веществ.

Кремы – мази мягкой консистенции, приготовленные на эмульсионной основе типа масло/вода или вода/масло, или множественные эмульсии.

Гели – мази, в которых для получения основы используются гелеобразователи природного и синтетического происхождения. Обладают упруго-пластичной консистенцией и способны сохранять свою форму.

Пасты – мази плотной консистенции суспензионного или комбинированного типа, содержание порошкообразных веществ в которых превышает 25 %.

Линименты – это жидкие мази.

В зависимости от назначения различают мази дерматологические, глазные, назальные, ушные, ректальные, вагинальные, уретральные и др.

В зависимости от основы выделяют мази на:

– гидрофобной основе;

- гидрофильной основе;
- эмульсионной основе;
- многофазной основе.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Технология мазей должна обеспечивать максимальное диспергирование и равномерное распределение действующих веществ в основе. Консистенция мази должна обеспечивать легкость нанесения и равномерное распределение на коже или слизистой оболочке. Стабильность мази должна гарантировать неизменность ее состава при хранении и применении.

Основу для мазей следует выбирать с учетом назначения лекарственного средства, эффективности, безопасности и биодоступности действующих веществ, совместимости компонентов лекарственного средства, реологических свойств, стабильности в течение срока годности.

Основы, используемые при производстве мазей, подразделяются на:

- *гидрофобные*: жировые (липофильные) (природные жиры, растительные масла, гидрогенизированные жиры и их сплав с растительными маслами и жироподобными веществами и др.), углеводородные (вазелин, вазелиновое масло, петролат, парафин, церезин и другие сплавы углеводородов), силиконовые (эсилон-аэросильная основа и др.) и пр.;

- *гидрофильные*: гели высокомолекулярных углеводов (эфиры целлюлозы, крахмала, агара) и белков (желатина, коллагена и др.), гели неорганических веществ (бентонита), гели синтетических высокомолекулярных соединений (полиэтиленоксида, поливинилпирролидона, полиакриламида) и др.;

- *дифильные*: абсорбционные основы – безводные сплавы гидрофобных основ (сплав вазелина с эмульгатором T_1 , T_2 или другими эмульгаторами), эмульсионные основы типа вода/масло (композиция воды, гидрофобной основы и соответствующего эмульгатора, консистентная эмульсия вода/вазелин и др.), реже – масло/вода (композиция липофильных компонен-

тов, эмульгаторов и воды, в качестве эмульгаторов используют натриевые, калиевые, триэтаноламиновые соли жирных кислот, полисорбат-80) и др.

В качестве вспомогательных веществ для мазей используют эмульгаторы типа масло/вода и вода/масло, гелеобразователи, антимикробные консерванты, антиоксиданты, солюбилизаторы, вещества, повышающие температуру плавления и вязкость, гидрофобные растворители, воду и гидрофильные растворители, отдушки и дезодорирующие средства, регуляторы pH, красители, ароматизаторы и др.

Мази на гидрофобной основе приготовлены, как правило, на углеводородных основах и могут содержать другие гидрофобные вспомогательные вещества (растительные масла, жиры животного происхождения, воски, синтетические глицериды и жидкие полиалкилсилоксаны). В их состав может быть введено только незначительное количество воды или водных растворов.

Мази на эмульсионной основе могут абсорбировать большое количество воды и образуют эмульсии типа вода/масло или масло/вода в зависимости от природы эмульгатора. Эмульсии вода/масло образуются при использовании таких эмульгаторов, как спирты шерстного воска, сложные эфиры, моноглицериды и жирные спирты. Эмульсии масло/вода образуются при использовании таких эмульгаторов, как жирные спирты, полисорбаты, цетостеариловый эфир макрогола, сложные эфиры жирных кислот с макроголами.

Мази на гидрофильной основе смешиваются с водой и обычно состоят из смесей жидких и твёрдых полиэтиленгликолей. В состав таких основ могут быть введены липофильные вещества и эмульгаторы типа масло/вода.

Кремы на гидрофобной эмульсионной основе приготовлены на основе эмульсии вода/масло или масло/вода/масло, стабилизированной подходящими эмульгаторами.

Кремы на гидрофильной эмульсионной основе приготовлены на основе эмульсии масло/вода или вода/масло/вода, стабилизированной подходящими эмульгаторами. К ним также относят коллоидные дисперсные системы, которые состоят из диспергированных в воде или в смешанных водно-

гликолевых растворителях высших жирных спиртов или кислот, которые стабилизированы гидрофильными ПАВ.

Олеогели – гели, приготовленные на основах, состоящих из гидрофобного растворителя (вазелиновое или растительное масло и др.) и липофильного гелеобразователя (полиэтилен низкомолекулярный, кремния диоксид коллоидный, алюминиевое или цинковое мыло и др.).

Гидрогели – гели, приготовленные на основах, состоящих из воды, гидрофильного смешанного или неводного растворителя (глицерин, пропиленгликоль, этанол, изопропанол) и гидрофильного гелеобразователя (карбомеры, производные целлюлозы, трагакант и др.)

ИСПЫТАНИЯ

Описание. В фармакопейной статье или нормативной документации описывают внешний вид и характерные органолептические свойства. Мази должны быть однородными и не должны иметь прогорклого запаха, а также признаков физической нестабильности (агрегации частиц, фазового расслоения, коагуляции).

Размер частиц. В мазях, содержащих компоненты в виде твердой дисперсной фазы (гетерогенных системах), контролируют размер частиц.

Размер частиц в мазях определяют методом оптической микроскопии (ОФС «Оптическая микроскопия») по следующей методике.

Прибор. Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, используют биологический микроскоп, снабженный окулярным микрометром при увеличении окуляра 15× и объектива 8×. Цену деления окулярного микрометра выверяют по объект-микрометру для проходящего света.

Используют предметные стекла, обработанные с одной стороны следующим образом: по середине стекла алмазом или каким-либо другим абразивным материалом наносят квадрат со стороной около 15 мм и диагоналями. Линии окрашивают с помощью карандаша по стеклу.

Методика. Отбирают пробу мази массой не менее 5 г. Если концентра-

ция действующих веществ в мазях превышает 10 %, то их разбавляют соответствующей основой до содержания около 10 % и перемешивают. При отборе проб следует избегать измельчения частиц.

Из пробы мази берут навеску 0,05 г и помещают на необработанную сторону предметного стекла. Предметное стекло помещают на водяную баню до расплавления основы, прибавляют каплю 0,1 % раствора судана III для жировых, углеводородных и эмульсионных основ типа вода/масло или раствора метиленового синего для гидрофильных и эмульсионных основ типа масло/вода и перемешивают. Пробу накрывают покровным стеклом (24×24 мм), фиксируют его путем слабого надавливания и просматривают в 4 полях зрения сегментов, образованных диагоналями квадрата. Для одного препарата проводят 5 определений средней пробы. В поле зрения микроскопа должны отсутствовать частицы, размер которых превышает нормы, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации.

Возможно использование метода лазерной дифракции света (ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света»).

При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации размер частиц не должен превышать 100 мкм.

Методика определения и требования к размеру частиц в глазных мазях приведены в ОФС «Глазные лекарственные формы».

Глазные мази, упакованные в металлические тубы, дополнительно контролируют по показателю «**Металлические частицы**» в соответствии с ОФС «Глазные лекарственные формы».

Герметичность упаковки. Для стерильных и, при необходимости, для нестерильных мазей, упакованных в тубы, проводят определение герметичности упаковки. Данный показатель контролируют в процессе производства.

Отбирают 10 туб лекарственного средства и тщательно вытирают их наружные поверхности фильтровальной бумагой. Тубы помещают в горизон-

тальном положении на лист фильтровальной бумаги и выдерживают в термостате при температуре $(60 \pm 3)^\circ\text{C}$ в течение 8 ч.

На фильтровальной бумаге не должно быть подтеков ни из одной тубы. Если подтеки наблюдаются только из одной тубы, испытание проводят дополнительно еще с 20 тубами. Если подтеки наблюдаются более чем из одной тубы, результаты испытания считают неудовлетворительными.

Результаты испытания считают удовлетворительными, если не наблюдается подтеков из первых 10 туб или наблюдались подтеки только для одной из 30 туб.

pH. Испытание проводят в зависимости от типа основы и состава лекарственного средства. Определяют pH водной вытяжки из мази или pH самой мази. Требования, предъявляемые к pH, и методики определения приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Кислотное число и перекисное число. Контролируют, при необходимости, в мазях, в состав которых входят вещества, способные к гидролизу и окислению, в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число» и «Перекисное число». Нормативные требования и методики определения приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». При использовании туб предпочтительно использование металлических туб с внутренним лаковым покрытием или туб из полимерных материалов с защитной мембраной и латексным кольцом.

Упаковка стерильных мазей должна быть герметичной и иметь приспособление для контроля первого вскрытия, например, защитную мембрану.

Упаковка назальных, ушных, глазных, ректальных и вагинальных мазей обычно укомплектована соответствующими аппликаторами.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Для стерильных мазей обязательно указание о стерильности. При необходимости на упаковке указывают срок хранения после первого вскрытия.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Для стерильных мазей необходимо устанавливать срок хранения после первого вскрытия.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Пластыри
медицинские**

ОФС.1.4.1.0009.15

**Взамен ГФ X, ст. 238,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Пластыри медицинские – лекарственная форма, содержащая одно или несколько действующих веществ, предназначенная для наружного применения и обладающая способностью прилипать к коже.

Пластыри, содержащие действующее вещество (вещества), могут применяться в виде пластичной однородной массы, в которой распределены действующие вещества (на подложке или без нее), или в виде прокладки с действующим веществом (веществами), закрепленной на подложке с липким слоем.

Пластыри оказывают действие на кожу, подкожные ткани или обладают системным действием на организм (см. ОФС «Трансдермальные пластыри»).

Пластыри, не содержащие действующих веществ, в виде липкой ленты используются для фиксации повязок и других целей и не являются лекарственным средством.

Пластырная масса представляет собой однородную смесь, плотную при комнатной температуре и размягчающуюся, липкую при температуре тела.

Подложка (или гибкий плоский носитель), полученный из синтетических или природных материалов, и липкий слой должны быть гипоаллергенны и не должны оказывать на кожу раздражающего действия.

Липкий слой на пластырях должен быть защищен от контакта с окру-

жающей средой с помощью защитной пленки, удаляемой непосредственно перед применением, или каким-либо другим способом.

В состав пластырной массы могут быть внесены наполнители, антиоксиданты, консерванты, красители, корректоры запаха или другие вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению.

Пластыри медицинские должны легко удаляться с кожи, не оставляя следов, не нанося повреждений и не отделяя пластырную массу от носителя.

Пластыри медицинские, предназначенные для нанесения на раневую поверхность, должны быть стерильными.

В зависимости от состава пластырной массы различают виды пластырей:

- свинцовые;
- смоляно-восковые (мозольный пластырь);
- каучуковые (лейкопластырь, лейкопластырь бактерицидный, перцовый пластырь, пластырь кровоостанавливающий);
- жидкие (кожные клеи).

В зависимости от носителя различают пластыри на тканевой, нетканой и полимерной основе. Отдельную группу составляют пластыри без носителя: жидкие (кожные клеи) и твердые пластырные массы (в виде брусков, цилиндров, плиток, палочек).

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Технология получения пластырей зависит от того, к какому виду они относятся.

Свинцовые пластыри, содержащие в своем составе свинцовое мыло, получают сплавлением свинцовых мыл со смолами, восками, действующими веществами.

Основу смоляно-восковых пластырей составляют сплавы смол и воска, в состав которых могут входить также жиры и углеводороды.

Каучуковые (или резиновые пластыри) представляют собой смесь каучука со смолами, действующими и вспомогательными веществами. Данный

вид пластырей длительное время сохраняет свою клейкость.

Кожные клеи (или пластыри жидкие) – это вязкие жидкости, оставляющие на коже после испарения легколетучего растворителя эластичную липкую прочную пленку. Пластырная пленка в них образуется за счет пленкообразования при высыхании растворов канифоли, нитроцеллюлозы и перхлорвиниловой и формальдегидной смол в органических растворителях. Для придания пленке большей эластичности в состав клеев вводят растительные масла, линетол, дибутилфталат, триацетин, цетиловый спирт.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание цвета и запаха пластырной массы и ее однородности, материала подложки для нанесения пластырной массы, защитной пленки, форм и размеров пластыря.

Количество пластырной массы. *Раздел вводят, если содержание лекарственного вещества выражают на грамм пластырной массы.* Определение проводят гравиметрическим методом. Результат выражают в г/м².

Масса (объем) содержимого упаковки. *Раздел вводят для пластырей без подложки.* Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Количественное определение. Для пластырей с носителем результат определения выражают как содержание действующего вещества в миллиграммах на пластырь, грамм пластырной массы или на грамм прокладок.

Для пластырей без носителя результат определения выражают в процентах.

Свинцовые пластыри дополнительно контролируют по показателям «Посторонние примеси» (пероксид свинца, карбонат свинца и оксид свинца) и «Потеря в массе при высушивании» (должна быть не более 1,0 %).

Определение содержания посторонних примесей в свинцовом пластыре проводят по следующей методике: 1 г препарата с 10 г теплого очищенного скипидара должен давать опалесцирующий раствор, из которого через 5 мин выпадает осадок светло-желтого или светло-серого цвета (свинцовая соль

жирных кислот), но не белый осадок (пероксид свинца, карбонат свинца и оксид свинца).

Жидкие пластыри (кожные клеи) дополнительно контролируют по показателям «Растворимость», «рН» (фильтрат должен иметь нейтральную реакцию), «Потеря в массе при высушивании» (от 3,8 до 4,2 %).

Если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, пластыри контролируют по дополнительным показателям («Цинка оксид», «Сопротивление отслаиванию» и др.).

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Каждый пластырь медицинский на носителе помещают в индивидуальную первичную упаковку.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Порошки**ОФС.1.4.1.0010.15****Взамен ГФ X, ст. 565,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Порошки – лекарственная форма, состоящая из твердых отдельных сухих частиц различной дисперсности, обладающая свойством сыпучести.

Порошки должны быть однородными при рассмотрении невооруженным глазом и иметь размер частиц не более 160 мкм, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Порошки могут представлять собой дозированную или недозированную лекарственную форму, содержащую одно или несколько действующих веществ или их смесей со вспомогательными ингредиентами.

В зависимости от способа применения различают:

- порошки для наружного применения;
- порошки для местного применения;
- порошки для приготовления растворов или суспензий для наружного применения;
- порошки для приготовления растворов или суспензий для местного применения;
- порошки для приготовления растворов или суспензий для парентерального применения;
- порошки для приготовления глазных капель (и глазных примочек);
- порошки для приема внутрь;
- порошки для приготовления растворов, капель или суспензий для приема внутрь. Среди них различают порошки «шипучие». Порошки «шипучие»

чие» предназначены для растворения в воде перед применением;

- порошки для ингаляций.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Процесс получения порошков состоит из следующих стадий:

- измельчение исходных веществ;
- получение однородного порошка (просеивание);
- смешивание;
- фасовка, упаковка, маркировка.

В качестве вспомогательных веществ, входящих в состав порошков, используют индифферентные наполнители, солюбилизаторы, корригенты вкуса, красители, консерванты, разрешенные к медицинскому применению.

Порошки могут содержать вспомогательные вещества, обеспечивающие растворение или диспергирование, предотвращающие слеживаемость, снижающие гигроскопичность, регулирующие или стабилизирующие pH, либо стабилизирующие фармацевтическую субстанцию и др.

Порошки «шипучие» для приема внутрь содержат, главным образом, вещества кислотного и основного характера, которые в присутствии воды быстро реагируют с выделением углерода диоксида. Порошки для ингаляций содержат одну или несколько тонкодисперсных фармацевтических субстанций вместе с инертными вспомогательными веществами – «носителями» (обычно лактоза) или без них.

В зависимости от лекарственной формы и способа применения к порошкам предъявляют различные требования в отношении дисперсности. Дисперсность порошков характеризуется размером отверстия сита, через которое проходит порошок. Размер частиц порошка выражают в микронах. При получении порошков для наружного, местного применения и/или для приготовления суспензий для наружного, местного применения необходимо предусматривать соответствующий размер частиц с указанием его в фармакопейной статье или нормативной документации.

При получении многокомпонентных порошков каждое вещество из-

мельчают отдельно и просеивают через соответствующее сито в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ». Фармацевтические субстанции в порошках для ингаляций микронизируют (измельчают в специальных микронизирующих устройствах).

Ядовитые и сильнодействующие вещества в количествах менее 0,05 г на всю массу используют в виде тритураций – смеси с молочным сахаром или другими вспомогательными веществами, разрешенными к медицинскому применению (1:100 или 1:10).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Порошки должны быть однородными при рассмотрении невооруженным глазом и иметь размер частиц не более 160 мкм, если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или «Определение воды».

Размер частиц. Размер частиц порошков для наружного применения определяют ситовым анализом в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ» или другим валидированным методом.

Количественное определение. Для количественного определения берут навеску не менее 10 г порошка.

Для порошков, предназначенных для приготовления растворов, при необходимости дополнительно контролируют **время растворения** и **рН** полученных растворов.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, содержание определяемых веществ выражается в мг или ЕД в одной дозе для дозированных порошков или в 1 г препарата для недозированных порошков.

Дозированные порошки должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования» и ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

ОСОБЕННОСТИ ИСПЫТАНИЙ ОТДЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Порошки для местного применения и/или для приготовления растворов или суспензий для местного применения. Порошки для местного применения, а также полученные из них растворы или суспензии, предназначенные для использования на открытых ранах или на поврежденной коже, должны быть стерильными.

Порошки для приготовления раствора или суспензии для парентерального применения должны быть стерильными и должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Порошки для приготовления капель глазных должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Порошки для приготовления суспензий для приема внутрь. Для порошков, используемых для приготовления суспензий для приема внутрь, должен быть дополнительно предусмотрен контроль получаемой суспензии по показателям «Размер частиц» и «Седиментационная устойчивость» в соответствии с требованиями ОФС «Суспензии».

Порошки для ингаляций. Испытание однородности дозирования порошков для ингаляций проводят в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Для дозированных порошков для ингаляций дополнительно определяют содержание респирабельной фракции в одной дозе порошка в соответствии с ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц» и количество доз в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Каждую дозу дозированных порошков расфасовывают в индивидуальную упаковку или по несколько доз в упаковку со специальным устройством для до-

зирования отдельной дозы.

Упаковка для дозированных порошков для ингаляций представляет собой индивидуальные ингаляторы: капсульные (спинхалер, ротахалер, дискхалер), резервуарные (турбухалер, циклохалер, изихалер), мультидозированные (мультидиск), обеспечивающие дозирование и введение действующего вещества в дыхательные пути.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворы**ОФС.1.4.1.0011.15****Вводится впервые**

Растворы – жидкая лекарственная форма, получаемая растворением жидких, твердых или газообразных веществ в соответствующем растворителе или смеси взаимосмешивающихся растворителей с образованием однородных дисперсных систем.

Данная статья не распространяется на растворы, предназначенные для офтальмологического, парентерального и ингаляционного применения.

Растворы для парентерального применения должны выдерживать требования ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения»; растворы для офтальмологического применения – требования ОФС «Глазные лекарственные формы»; растворы для ингаляционного применения – требования ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

К растворам относятся следующие лекарственные формы:

- собственно растворы,
- капли,
- микстуры,
- ароматные воды,
- сиропы,
- концентраты для приготовления растворов.

По способу применения различают растворы для приема внутрь, наружного и местного применения.

В зависимости от природы растворителя растворы разделяют на вод-

ные и неводные.

Растворы для приема внутрь, для наружного и местного применения – растворы, содержащие одно или более действующих веществ в соответствующем растворителе или состоящие только из жидких веществ, предназначенные для приема внутрь; нанесения на кожные покровы; нанесения на слизистые оболочки и для орошения полостей тела соответственно.

Капли – жидкая лекарственная форма, содержащая одно или несколько действующих веществ, растворенных или диспергированных в соответствующем растворителе, и дозируемая каплями с помощью специального приспособления (капельница, пипетка и др.).

Микстуры – жидкая лекарственная форма преимущественно экстернорального изготовления, предназначенная для приема внутрь и дозируемая ложками. Сухие микстуры перед применением разводят водой до необходимого объема.

Ароматные воды – водные или водноспиртовые растворы, насыщенные компонентами эфирных масел.

Сиропы – жидкая лекарственная форма, преимущественно представляющая собой концентрированный раствор различных сахаров, содержащий действующие и вспомогательные вещества.

Концентраты для приготовления растворов – жидкие лекарственные формы высокой концентрации, предназначенные для получения растворов путём последующего их разведения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Растворы могут быть получены из концентратов и твердых лекарственных форм (порошков, таблеток, гранул, лиофилизатов и др.). Разновидностью концентрированных растворов являются стандартные фармакопейные растворы, которые представляют собой водные или спиртовые растворы некоторых действующих веществ (промышленного производства) строго определенной концентрации, указанной в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации.

Содержание действующих веществ в растворе выражают в процентной концентрации (массо-объемной, массовой или объемной). При изготовлении растворов используют массо-объемный способ приготовления.

Водные растворы получают растворением действующих и вспомогательных веществ в соответствующем растворителе, чаще всего в воде очищенной, разбавлением концентратов или стандартных фармакопейных растворов.

Воду и водные растворы, близкие по плотности к воде, отмеривают, твердые лекарственные вещества – отвешивают. Растворители и растворы, плотность которых больше или меньше 1,0, – отвешивают.

При получении растворов высокомолекулярных соединений учитывают природу субстанции. Растворы неограниченно набухающих высокомолекулярных соединений (пепсин, трипсин и др.) получают по общим правилам приготовления растворов. Растворение ограниченно набухающих высокомолекулярных соединений (желатин, крахмал, метилцеллюлоза и др.) протекает, как правило, в определенных условиях, способствующих предварительному их набуханию и последующему растворению. На стадии набухания эти условия предусматривают определенный объем растворителя, температурный режим, время набухания и соблюдение условий, обеспечивающих переход набухших высокомолекулярных соединений в раствор (нагревание или охлаждение).

Для приготовления растворов коллоидных соединений (протаргол, колларгол) используют дополнительные технологические операции, обеспечивающие гидратацию коллоидных частиц.

При получении масляных растворов для увеличения скорости растворения действующих и вспомогательных веществ используют нагревание.

Технология спиртовых растворов не подразумевает нагревание. В качестве основного растворителя используют спирт 96%, который при необходимости разводят водой очищенной до требуемой концентрации.

Ароматные воды получают несколькими способами: перегонкой эфир-

номасличного растительного сырья с водяным паром, растворением эфирного масла в воде или разведением концентратов. Для повышения устойчивости ароматных вод в их состав может быть добавлен спирт 96%.

Растворители

Растворители для растворов выбирают, исходя из свойств и природы действующего вещества или веществ, для обеспечения отсутствия возможного химического и физико-химического взаимодействия между растворителем и действующим веществом или веществами. Растворитель не должен оказывать влияния на фармакологическую активность действующего вещества или веществ.

В качестве основного растворителя для приготовления водных растворов для внутреннего, наружного или местного применения используют воду очищенную. В неводных растворах основными растворителями являются спирт этиловый различных концентраций, масла жирные, масло вазелиновое, глицерин и др.

Вспомогательные вещества

При изготовлении/производстве растворов в их состав могут быть добавлены подходящие антимикробные консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы, солюбилизаторы, соразтворители и корригенты, разрешенные к медицинскому применению.

Вспомогательные вещества не должны отрицательно влиять на заявленное терапевтическое действие лекарственного препарата, в используемых концентрациях не должны вызывать местное раздражение.

ИСПЫТАНИЯ

Растворы должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания по следующим показателям качества:

- «Описание»,
- «Извлекаемый объем» (для растворов для парентерального применения и растворов для приема внутрь) или «Объем содержимого упаковки»,

Сиропы должны соответствовать требованиям ОФС «Сиропы».

Дополнительно водные растворы и спиртовые растворы, изготовленные на спирте 96 %, контролируют по показателю «рН или кислотность или щелочность», неводные растворы контролируют по показателю «Плотность», растворы высокомолекулярных соединений – по показателю «Вязкость», масляные растворы – по показателям «Кислотное число» и «Перекисное число».

Контроль по показателю «Спирт этиловый» проводят для спиртовых растворов, полученных с использованием в качестве растворителя спирта этилового с концентрацией ниже 40% в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах», при концентрации выше 40% нормируется показатель качества «Плотность».

Показатель качества «Извлекаемый объем» определяют для растворов для парентерального применения и растворов для приема внутрь, для остальных растворов определяют показатель «Объем содержимого упаковки».

При необходимости растворы контролируют по показателям «Прозрачность», «Цветность», «Стерильность» в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Испытания проводят в соответствии с требованиями соответствующих ОФС на методы анализа.

рН определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, и отмечают допустимый интервал значений рН. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия».

При установлении пределов кислотности или щелочности растворов с помощью индикаторов используют растворы кислот или щелочей с концентрацией от 0,01 до 0,1 М.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте в условиях, предусмотренных фармакопейной статьей или нормативной документацией.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Сиропы**ОФС.1.4.1.0012.15****Взамен ГФ X, ст. 614,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Сиропы – жидкая лекарственная форма, предназначенная для приема внутрь, преимущественно представляющая собой концентрированный раствор различных сахаров, содержащий действующие и вспомогательные вещества.

Сиропы – это, как правило, прозрачные жидкости вязкой консистенции, обладающие сладким вкусом. В зависимости от состава и физико-химических свойств действующих и вспомогательных веществ они могут иметь опалесценцию или представлять собой гетерогенные дисперсные системы (чаще всего суспензии), приобретать характерный цвет и запах.

Для предотвращения кристаллизации сиропообразующего компонента и корректировки других показателей в сиропы могут быть введены глицерин, различные полиспирты, поверхностно-активные вещества и другие вспомогательные вещества, разрешенные для приема внутрь.

Требования данной статьи распространяются также на сиропы, получаемые растворением порошков и гранул.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Сиропы получают путем растворения в воде сахаров или других сиропообразующих веществ (например, полиспиртов) при нагревании до температуры кипения. Обычно концентрация сахара или другой сиропообразующей субстанции в готовом сиропе составляет не менее 45 % (м/м). Готовый сироп фильтруют. Добавление действующих веществ, настоек, экстрактов,

консервантов и т.д. производят после охлаждения сиропа до температуры $(55 \pm 5) ^\circ\text{C}$.

В состав сиропов обычно вводят антимикробные консерванты: спирт этиловый, метилпарагидроксibenзоат, пропилпарагидроксibenзоат, сорбиновую кислоту, калия сорбат, натрия бензоат и др.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание внешнего вида сиропа с указанием цвета и запаха. Сиропы, как правило, должны быть прозрачными, допускается наличие опалесценции, не допускается наличие признаков кристаллизации сиропообразующего компонента.

Плотность. Испытание проводят одним из методов, описанных в ОФС «Плотность». Нормы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

рН. Определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». В качестве средства для отмеривания предписанной дозы в комплекте упаковки могут быть предусмотрены мерная ложка, стаканчик или колпачок.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 $^\circ\text{C}$, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Суппозитории**ОФС.1.4.1.0013.15****Взамен ГФ X, ст. 647,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Суппозитории – твердая при комнатной температуре дозированная лекарственная форма, содержащая одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в подходящей основе, предназначенная для введения в полости тела и расплавляющаяся (растворяющаяся, распадающаяся) при температуре тела.

Различают суппозитории ректальные, вагинальные и палочки.

Ректальные суппозитории обычно имеют коническую или торпедообразную форму и могут использоваться как для обеспечения местного действия, так и для достижения системного эффекта. Масса одного суппозитория должна находиться в пределах от 1 до 4 г. Если масса не указана, то изготавливают суппозитории массой 3 г. Масса суппозитория для детей должна быть от 0,5 до 1,5 г. Максимальный диаметр суппозитория не должен превышать 1,5 см.

Вагинальные суппозитории в основном имеют шарообразную или яйцевидную форму и, как правило, предназначены для местного действия. Масса их должна находиться в пределах от 1,5 до 6 г. Если масса не указана, то вагинальные суппозитории изготавливают массой 4 г.

Палочки имеют форму цилиндра с заостренным концом и диаметром не более 0,2 – 0,5 см. Масса палочки должна быть от 0,5 до 1 г.

Масса и размеры суппозитория должны соответствовать пути их введения.

Основы, используемые при производстве суппозитория, подразделя-

ются на липофильные, гидрофильные и дифильные.

В качестве липофильных основ для получения суппозиториев применяют масло какао, сплавы масла какао с парафином и гидрогенизированными жирами, растительные и животные гидрогенизированные жиры, твердый жир, ланоль, сплавы гидрогенизированных жиров с воском, твердым парафином и другие основы, разрешенные для медицинского применения.

В качестве гидрофильных основ используют желатино-глицериновые гели, сплавы полиэтиленоксидов различных молекулярных масс и другие основы, разрешенные для медицинского применения.

Дифильные основы представляют собой искусственные композиции, обладающие липофильными и гидрофильными свойствами и содержащие в своем составе поверхностно-активные вещества. К дифильным основам относят также сложные эфиры высших жирных кислот типа Витепсол, Лазупол, Суппорин М и другие основы, разрешенные к медицинскому применению.

В зависимости от состояния действующего вещества (растворимое или нерастворимое в суппозиторной основе) суппозитории могут быть гомогенными или гетерогенными.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Суппозитории в промышленных условиях могут быть получены методом выливания расплавленной массы в формы или методом прессования.

В аптеках суппозитории получают методом ручного формования или выливания.

Наиболее часто применяемым в промышленном производстве является метод выливания расплавленной массы в формы. Производство суппозиториев указанным способом проводится по следующей схеме: приготовление основы, подготовка действующих веществ, введение в основу действующих веществ и гомогенизация, формование и упаковка.

Действующие вещества, при необходимости измельченные и просеянные, вводят непосредственно в основу в виде водного раствора или раствора

в другом подходящем гидрофильном растворителе (для гидрофильных веществ), в виде раствора в жирах или липофильных растворителях (для липофильных веществ) или суспензий растёртых порошков в основах (нерастворимые в воде и жирах).

Термолабильные вещества вводят в основу перед гомогенизацией и формированием при минимально возможной температуре основы, необходимой для сохранения качества веществ и структурных свойств основы.

Метод прессования используется реже. Его преимуществами являются возможность избежать деструкции термолабильных действующих веществ, отсутствие седиментации действующего вещества и предотвращение его несовместимости с расплавленной суппозиторной основой.

В состав суппозитория могут входить различные группы разрешённых для медицинского применения вспомогательных веществ: эмульгаторы, консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы и другие.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории должны иметь однородную массу, одинаковую форму и обладать твердостью, обеспечивающей удобство применения. Однородность определяют визуально на продольном срезе по отсутствию вкраплений. На срезе допускается наличие воздушного стержня или воронкообразного углубления.

В отдельных случаях допускается наличие вкраплений, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Размер частиц. В случае введения в суппозиторную основу действующего вещества в виде суспензии, необходимо контролировать размер частиц в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия». Описание подготовки образца и требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации. Размер частиц не должен превышать 100 мкм, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворение. Для суппозитория на гидрофильной основе проводят

испытание в соответствии с ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм», для суппозиторий на липофильной основе – по ОФС «Растворение для суппозиторий на липофильной основе».

Если предусмотрено это испытание, то испытание на распадаемость не требуется.

Распадаемость. Если суппозитории не предназначены для модифицированного высвобождения, в том числе пролонгированного местного действия, они должны выдерживать испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость суппозиторий и вагинальных таблеток». Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, образцы суппозиторий на липофильной основе должны распадаться через 30 мин; образцы суппозиторий на гидрофильной основе – через 60 мин.

Если для суппозиторий на липофильной основе предусмотрено определение времени полной деформации или температуры плавления, то испытание на распадаемость не требуется.

Температура плавления. Для суппозиторий, полученных на липофильной основе, определяют температуру плавления по методу 2 (ОФС «Температура плавления»), которая не должна превышать 37 °С, если нет других указаний в фармакопейных статьях или нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации.

Время полной деформации. Для суппозиторий на липофильной основе проводят испытание в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиторий на липофильной основе». Время полной деформации не должно превышать 15 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Если предусмотрено это испытание, то испытание на распадаемость не требуется.

Однородность массы. Для суппозиторий проводят определение однородности массы в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Если предусмотрено определение од-

нородности дозирования, определение однородности массы не требуется.

Однородность дозирования. Для суппозиториев проводят определение однородности дозирования в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Суспензии – жидкая лекарственная форма, представляющая собой гетерогенную дисперсную систему, содержащую одно или несколько твердых действующих веществ, распределенных в жидкой дисперсионной среде.

Суспензии могут быть готовыми к применению, а также готовиться непосредственно перед применением из порошков, гранул, таблеток и воды или другой подходящей жидкости, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Суспензии используют для приема внутрь, ингаляций, наружного, местного и парентерального применения.

Порошки, гранулы и таблетки для приготовления суспензий должны соответствовать требованиям ОФС «Порошки», «Гранулы» или «Таблетки» соответственно. Суспензии для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения». Суспензии для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций». Суспензии в форме капель глазных должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

В качестве вспомогательных веществ в суспензиях могут быть использованы буферные растворы, стабилизаторы (вещества, повышающие вязкость дисперсионной среды, поверхностно-активные вещества и др.), корригенты,

консерванты, антиоксиданты, красители и другие, разрешенные к медицинскому применению вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. После взбалтывания суспензия должна представлять собой жидкость с однородно распределенными в ней частицами; указывают цвет и при необходимости запах.

рН. Определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия».

Размер частиц. Определение размера частиц в суспензиях проводят методами оптической микроскопии (ОФС «Оптическая микроскопия») и лазерной дифракции (ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света»).

Размер частиц определяют методом оптической микроскопии по следующей методике.

Определенное количество суспензии, соответствующее 10 мкг твердого лекарственного вещества, вносят в счетную камеру или с помощью микропипетки наносят на предметное стекло и просматривают под микроскопом всю площадь образца. Вначале образец просматривают при малом увеличении (например, 50×), отмечая частицы с максимальным размером более 25 мкм. Затем проводят измерение этих частиц при большем увеличении (например, от 200× до 500×).

Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 100 мкм, если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для капель глазных суспензионного типа на 10 мкг твердого лекарственного вещества должно приходиться не более 20 частиц с максимальным размером более 25 мкм, из них – не более 2 частиц с максимальным размером более 50 мкм, не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм.

Проходимость через иглу. Определение проводят в суспензиях для парентерального применения по методике, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8×40, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Седиментационная устойчивость. Определение проводят по следующей методике. Лекарственный препарат тщательно взбалтывают и переносят из флакона (или другой упаковки, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации) в мерный цилиндр или стеклянную пробирку. Флакон (или другую соответствующую упаковку) также осматривают. Для осмотра полимерного флакона его разрезают на части. На дне и стенках флакона (упаковки) не должно наблюдаться агрегатов и агломератов частиц дисперсной фазы.

Для суспензий, предназначенных для парентерального применения и приема внутрь, время ресуспендирования должно быть не более 1 мин, для капель глазных рекомендуемое время ресуспендирования – не более 30 с.

Не должно наблюдаться признаков седиментации и образования агрегатов и агломератов в течение времени, необходимого для осуществления приема (введения) лекарственного препарата. Как правило, для суспензий, предназначенных для парентерального применения и приема внутрь, капель глазных суспензионного типа оно должно быть не менее 2-3 мин.

Вязкость. Определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» методом ротационной вискозиметрии при 25 °С. Определение вязкости должно быть предусмотрено для суспензий, если в их состав входят вещества, увеличивающие вязкость.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Суспензии выпускаются как в многодозовой, так и в однодозовой упаковке, снабженной при необходимости приспособлением, обеспечивающим удобст-

во применения и дозирования лекарственного средства.

В качестве средства для отмеривания предписанной дозы в комплекте упаковки могут быть предусмотрены мерная ложка или стаканчик, капельница и др.

Суспензии для парентерального применения, капли глазные и суспензии для нанесения на поврежденную кожу выпускаются в стерильной воздухо-непроницаемой упаковке.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На этикетке должна быть предусмотрена предупредительная надпись «Перед употреблением взбалтывать».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Таблетки – твердая дозированная лекарственная форма, чаще всего получаемая прессованием порошков или гранул, содержащих одно или более действующих веществ с добавлением или без вспомогательных веществ.

Таблетки обычно представляют собой прямые круглые цилиндры с плоской или двояковыпуклой верхней и нижней поверхностью, цельными краями. Таблетки могут иметь и иную форму, например, овальную, многоугольную и др. Возможно наличие фаски.

Наличие оболочки, скорость и характер высвобождения действующего вещества, способ получения, способ применения таблеток и путь введения определяют классификационное деление таблеток на группы.

Различают таблетки без оболочки (таблетки) и таблетки, покрытые оболочкой.

Таблетки, покрытые оболочкой – таблетки, покрытые одним или несколькими слоями смеси различных веществ, предназначенные для приема внутрь. В зависимости от состава и способа нанесения различают дражированное, пленочное и прессованное покрытия.

Если оболочка представляет собой тонкое полимерное покрытие массой до 10 %, используют термин «таблетки, покрытые пленочной оболочкой».

По скорости и характеру высвобождения выделяют таблетки с обычным и модифицированным высвобождением.

Оболочка может быть защитной или обеспечивать разрушение таблетки в определенном отделе желудочно-кишечного тракта, или регулировать время высвобождения действующих веществ.

Таблетки кишечнорастворимые – таблетки, устойчивые к воздействию желудочного сока и высвобождающие действующее вещество (вещества) в кишечном соке. Получают путем покрытия таблеток кишечнорастворимой оболочкой (в этом случае таблетки называют «покрытыми кишечнорастворимой оболочкой») или прессованием гранул или частиц, предварительно покрытых устойчивой к желудочному соку оболочкой.

Таблетки с модифицированным высвобождением – таблетки, покрытые оболочкой и без оболочки, содержащие специальные вспомогательные вещества и/или полученные по особой технологии, которые позволяют регулировать скорость и/или время и/или место высвобождения действующего вещества.

Модифицированное (нестандартное) высвобождение может быть замедленным непрерывным, прерывистым (пульсирующим), отсроченным и ускоренным.

Таблетки с пролонгированным высвобождением – таблетки, покрытые оболочкой или без оболочки, содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по особой технологии, что позволяет обеспечивать замедленное непрерывное высвобождение действующих веществ. Пролонгация высвобождения может быть достигнута при использовании:

- специального покрытия таблеток;
- технологии создания многослойных таблеток;
- технологии создания таблеток с нерастворимым каркасом;
- иных способов иммобилизации действующих веществ на инертном носителе.

Таблетки с пульсирующим высвобождением – таблетки с периодическим высвобождением действующего вещества. В названии лекарственной формы используют термин «таблетки с пульсирующим высвобождением».

Таблетки с ускоренным высвобождением – таблетки, содержащие специальные вспомогательные вещества и/или полученные по особой технологии, что позволяет обеспечивать увеличение скорости высвобождения действующего вещества.

По способу применения разделяют:

- таблетки, которые проглатывают целыми;
- таблетки жевательные;
- таблетки, применяемые после предварительного приготовления на их основе жидких лекарственных форм. В этом случае различают таблетки растворимые, диспергируемые, шипучие;
- таблетки для применения в полости рта (таблетки подъязычные (сублингвальные), защечные (трансбуккальные), для рассасывания);
- таблетки, диспергируемые в полости рта;
- таблетки вагинальные.

Таблетки жевательные – таблетки без оболочки, которые необходимо разжевать.

Таблетки растворимые – таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой, которые растворяют в подходящем растворителе перед применением; полученный раствор может быть слабо опалесцирующим.

Таблетки шипучие – таблетки без оболочки, содержащие вещества кислого и основного характера (карбонаты или гидрокарбонаты), которые быстро реагируют в воде с выделением углерода диоксида; они предназначены для растворения или диспергирования в воде непосредственно перед применением.

Таблетки диспергируемые – таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой, диспергируемые в соответствующем растворителе перед применением с образованием суспензии.

Также различают таблетки для приготовления растворов, суспензий и паст для парентерального/местного/наружного применения.

Таблетки для применения в полости рта – обычно таблетки без обо-

лочки, полученные по специальной технологии с целью высвобождения действующего вещества или веществ в полости рта и обеспечения местного или системного действия (таблетки подъязычные, защечные, для рассасывания).

Таблетки подъязычные (сублингвальные) – таблетки, помещаемые под язык с целью получения системного действия.

Таблетки защечные (транsbуккальные) – таблетки, помещаемые в щечный карман с целью получения системного действия.

Таблетки для рассасывания – таблетки, помещаемые в полость рта для последующего рассасывания обычно для получения местного действия. Состав таблеток обеспечивает медленное высвобождение действующих веществ.

Таблетки, диспергируемые в полости рта – таблетки, которые помещают в полость рта, где они быстро диспергируются до проглатывания.

Таблетки вагинальные – таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой, предназначенные для вагинального применения, обычно для оказания местного действия.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Наиболее распространенным методом производства таблеток является метод прессования (прямое прессование или с применением влажного или сухого гранулирования), реже используется формование и лиофилизация. Формованные таблетки производят под низким давлением из увлажненной порошковой массы путем ее втирания в специальные формы или формовки расплавленной массы. Лيوфилизированные таблетки (относятся к лекарственной форме «лиофилизаты») производят путем лиофилизации жидкостей или гелей, содержащих действующие вещества. Таблетки, полученные способом лиофилизации, быстро растворяются, будучи помещенными в полость рта, или их растворяют в воде перед применением.

В зависимости от технологии производства, способа применения таблеток, физико-химических свойств действующих веществ, их дозировки, скорости и характера высвобождения применяют различные вспомога-

ные вещества в соответствии с их назначением.

Разбавители используют для обеспечения необходимой массы таблетки, если в состав входит малое количество действующего вещества (или веществ). К этой группе относятся глюкоза (декстроза), крахмал, кальция гидрофосфат, кальция карбонат, лактозы моногидрат, магния карбонат, сорбит (сорбитол), микрокристаллическая целлюлоза, маннит (маннитол) и др.

Разрыхлители (дизинтегранты) включают в состав таблеток с целью обеспечения их распадаемости. К ним относятся набухающие разрыхлители: поперечно-сшитый повидон, алгиновая кислота и ее натриевая и калиевая соли, крахмал (в том числе химически модифицированный), метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза (кармеллоза натрия), кроскармеллоза, кросповидон, мальтоза, микрокристаллическая целлюлоза; газообразующие разрыхлители: твердые органические кислоты в сочетании с карбонатами или гидрокарбонатами и смачивающие – поверхностно активные вещества.

Связующие вещества вводят для обеспечения прочности гранул и таблеток. С этой целью используют крахмальный клейстер, желатин, сахарозу, натрия алгинат, гели алгиновой кислоты, природные камеди, макрогол, производные целлюлозы, повидон, повидон-винилацетат (коповидон) и др.

Вещества, способствующие скольжению, препятствуют прилипанию к пресс-инструменту, оказывают смазывающее действие, улучшают текучесть таблетлируемых смесей. К ним относятся крахмал, тальк, аэросил (кремния диоксид коллоидный), каолин, обезжиренный молочный порошок, макрогол, полисорбат, стеариновая кислота и ее кальциевая и магниевая соли, полисорбат-80, натрия лаурилсульфат и др. Они замедляют скорость распадаемости таблетки и растворения действующего вещества, поэтому не рекомендуется превышать содержание полисорбата-80, стеариновой кислоты, кальция и магния стеарата более чем на 1 %, талька – на 3 %, аэросила – на 10 % от массы таблетки.

В состав жевательных таблеток в качестве вспомогательных веществ обычно входят маннит (маннитол), сорбит (сорбитол), сахароза и др.

Для нанесения оболочек могут быть использованы различные вспомогательные вещества, условно подразделяющиеся на следующие группы: адгезивные вещества, обеспечивающие прилипание материалов покрытия оболочки к ядру таблетки – сахарный сироп, магния оксид; вещества, создающие каркасы – сахароза, тальк, магния карбонат основной (магния гидроксикарбонат), этилцеллюлоза; пластификаторы, которые придают покрытиям свойства пластичности – растительные масла, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза (кармеллоза), полисорбат и др.; вещества, придающие покрытиям свойства влагостойкости – аэросил (кремния диоксид коллоидный), шеллак, полиакриловые смолы и др.; красители и корригенты вкуса и запаха.

Корригенты вкуса, ароматизаторы и красители используют для улучшения внешнего вида таблеток и придания им необходимого вкуса и запаха, маркировки дозы, а также идентификации препарата.

При нанесении оболочки методом наращивания используют гуммиарабик (акация камедь), желатин, сахарный сироп, магния карбонат основной (магния гидроксикарбонат), крахмал, метилцеллюлозу, муку пшеничную, кальция стеарат, кальция карбонат, натрия алгинат, тальк, магния оксид и др.

В состав пленочных оболочек входят такие вещества, как гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза), гидроксипропилцеллюлоза (гипролоза), карбоксиметилцеллюлоза (кармеллоза), ацетилфталилцеллюлоза (целлацефат), метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза (кармеллоза натрия), сополимеры метакриловой кислоты и ее эфиров, макрогол, повидон, желатин и др.

Для получения прессованных покрытий используют сахарозу, лактозу, крахмал, муку пшеничную, стеариновую кислоту и др.

Технология производства таблеток должна обеспечивать необходимую устойчивость таблеток к истиранию и механическую прочность.

При производстве, упаковке и хранении таблеток должны быть приняты меры, обеспечивающие необходимую микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Оценку внешнего вида таблеток осуществляют при осмотре невооруженным глазом 20 таблеток.

Приводят описание формы и цвета таблеток. Поверхность таблетки должна быть гладкой, однородной, если не обосновано иное. На поверхности таблетки могут быть нанесены штрихи, риски для деления, надписи и другие обозначения. Для таблеток диаметром 9 мм и более рекомендуется наличие риски.

Однородность массы. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Если предусмотрено испытание на однородность дозирования, то контроль однородности массы не требуется.

Прочность на истирание. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Прочность таблеток на истирание» в рамках контроля технологического процесса производства таблеток.

Распадаемость

Таблетки без оболочки должны выдерживать испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации в качестве жидкой среды используют воду. Таблетки должны распадаться в течение 15 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Таблетки, покрытые оболочкой, должны выдерживать испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации в качестве жидкой среды используют воду. Таблетки должны распадаться в течение 30 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для кишечнорастворимых таблеток (покрытых оболочкой), если не

указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, проводят испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» со следующими изменениями. Испытание проводят в два этапа. В качестве жидкой среды на первом этапе используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М. Время устойчивости таблеток в кислой среде может зависеть от их состава, но не должно быть менее 1 ч и более 3 ч. Таблетки не должны распадаться и обнаруживать признаки растрескивания и размягчения. На втором этапе кислоту заменяют фосфатным буферным раствором с рН 6,8. Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то в буферном растворе таблетки должны распадаться в течение 1 ч.

Таблетки диспергируемые и таблетки растворимые должны распадаться в течение 3 мин. Испытание проводят по ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». В качестве жидкой среды используют воду с температурой от 15 до 25 °С.

Таблетки, полученные способом лиофилизации. Одну таблетку помещают в стакан, содержащий 200 мл воды при температуре от 15 до 25 °С. Время распадаемости не должно превышать 3 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации. Тест повторяют на 5 других таблетках. Таблетки удовлетворяют требованиям, если все 6 таблеток распались.

Таблетки для применения в полости рта (таблетки подъязычные, защечные, для рассасывания). Проводят испытание в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Время распадаемости проводят в фармакопейной статье или нормативной документации. В ряде случаев дополнительно нормируют время, в течение которого таблетка не должна распадаться.

Таблетки вагинальные. За исключением таблеток пролонгированного действия, испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость суппозиторий и вагинальных таблеток». Если не указано иначе в

фармакопейной статье или нормативной документации, время распадаемости таблеток не должно превышать 30 мин.

Таблетки шипучие должны распадаться или растворяться в течение 5 мин. Одну таблетку помещают в стакан, содержащий 200 мл воды при температуре от 15 до 25 °С, при этом начинают выделяться пузырьки газа. Таблетка считается распавшейся или растворившейся, если после прекращения выделения пузырьков газа вокруг нее или ее фрагментов, таблетка или растворилась, или диспергировалась в воде, и агломераты частиц отсутствуют. Тест повторяют на 5 других таблетках.

Растворение. Испытание проводят для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ одним из способов, описанных в ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено определение растворения, испытание на распадаемость таблеток не является обязательным.

Для таблеток пролонгированного действия проводят испытание, подтверждающее замедленное высвобождение действующего вещества.

Для кишечнорастворимых таблеток, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, проводят испытание, подтверждающее отсроченное высвобождение необходимого количества действующего вещества в соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».

Дисперсность. Испытание проводят для диспергируемых таблеток. Две таблетки помещают в колбу, содержащую 100 мл воды, и перемешивают до полного диспергирования. Должна образоваться однородная суспензия, проходящая через сито с номинальным размером отверстий 710 мкм.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Раздел вводят в тех случаях, когда содержание воды может влиять на свойства действующего вещества, стабильность препарата и т.д. Испытание обязательно для таблеток, полученных способом лиофилизации. Определение проводят в соответ-

ствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды».

Остаточные органические растворители. При использовании в технологическом процессе производства таблеток органических растворителей должен быть предусмотрен контроль их остаточного содержания в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители». Норму содержания органического растворителя приводят в мкг/таблетку, исходя из предельно допустимой суточной дозы растворителя и из максимальной суточной дозы препарата.

Определение вспомогательных веществ (талька, аэросила, кальция, магния стеарата и др.), содержание которых нормируется в фармакопейных статьях или нормативной документации, проводят по следующей методике.

Около 1 г (точная навеска) порошка растертых таблеток обрабатывают в сосуде 200 мл теплой воды, жидкость отфильтровывают через беззольный фильтр и сосуд тщательно ополаскивают водой. Остаток на фильтре несколько раз промывают теплой водой (по 10 мл) до отсутствия видимого остатка после выпаривания капли промывной воды на часовом стекле. Фильтр с остатком высушивают, сжигают, прокаливают и взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Если таблетки содержат несгораемые или нерастворимые в теплой воде вещества, то навеску таблеток после сжигания и прокаливания обрабатывают при нагревании 30 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 %, раствор фильтруют и остаток на фильтре промывают горячей водой до отсутствия в промывной воде реакции на хлориды. Фильтр с остатком высушивают, сжигают, прокаливают и взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Однородность дозирования. Таблетки должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Количественное определение. Для анализа берут навеску растертых таблеток (не менее 20 шт.). Если измельчение таблетки может повлечь за со-

бой разложение действующего вещества или затруднено получение однородно измельченного порошка, проводят испытание на целой таблетке или таблетках. В этом случае рекомендуется использовать не менее 10 таблеток.

За результат количественного определения может быть принято среднее значение, полученное в испытании на однородность дозирования.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На упаковке растворимых, шипучих и диспергируемых таблеток должна быть предупредительная надпись о необходимости предварительного растворения таблеток перед применением.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

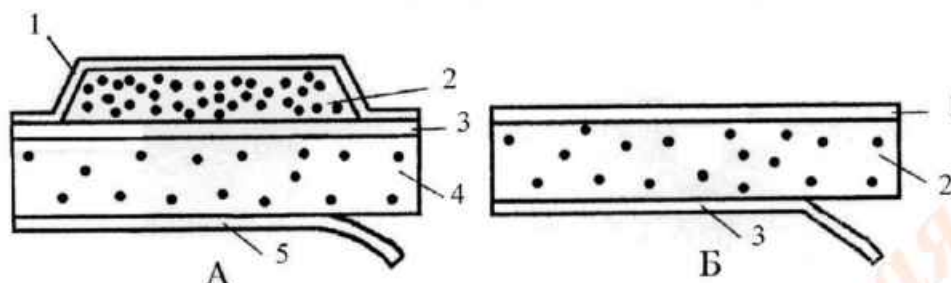
Трансдермальный пластырь – лекарственная форма для наружного применения, предназначенная для контролируемой доставки лекарственного вещества (веществ) в системный кровоток путём пассивной диффузии через неповрежденную кожу.

Трансдермальный пластырь представляет собой многослойный пластырь. Внешний покровный слой (подложка) является непроницаемым для действующего вещества и служит для придания жесткости всему пластырю, а также для защиты от внешнего воздействия. Со стороны поверхности высвобождения действующего вещества, предназначенной для аппликации на кожу, имеется защитное антиадгезионное покрытие, удаляемое непосредственно перед применением трансдермального пластыря.

Различают два основных вида трансдермальных пластырей: резервуарные и матричные (см. рисунок). В резервуарных трансдермальных пластырях (рисунок, А) действующее вещество/вещества находится в запаянном резервуаре в виде раствора, геля, суспензии или эмульсии. Внешний покровный слой резервуара представляет собой непроницаемую для содержимого резервуара полимерную пленку, а внутренний, обращенный к коже слой, – полимерную мембрану, регулирующую скорость выхода действующего вещества/веществ из резервуара на кожу через слой адгезива. Адгезив обеспечивает прочное крепление пластыря на коже.

Матричные трансдермальные пластыри устроены более просто (рисунок, Б). Внешний покровный слой представляет собой непроницаемую для

действующего вещества гибкую полимерную пленку, к которой прикреплена полимерная адгезионная матрица, содержащая действующие и вспомогательные вещества.



- А 1 – внешний слой;
2 – резервуар с лекарственным веществом;
3 – мембрана;
4 – адгезив;
5 – защитное антиадгезионное покрытие.

- Б 1 – внешний слой;
2 – полимерная адгезионная матрица;
3 – защитное антиадгезионное покрытие.

Рисунок – Схемы трансдермальных пластырей: резервуарный (А) и матричный (Б)

Площадь внешнего покровного слоя может быть равна площади высвобождения (подачи) действующего вещества/веществ (т.е. резервуара или полимерной адгезионной матрицы) или быть несколько больше, для нанесения по краям пластыря адгезива. Защитное покрытие также может быть несколько больше, чем сам трансдермальный пластырь, что облегчает процесс его удаления.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

При производстве трансдермальных пластырей должны соблюдаться необходимые меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Вспомогательные вещества, входящие в состав трансдермальных пластырей, не должны обладать местнораздражающим, аллергизирующим и токсическим действием.

В качестве вспомогательных веществ могут быть использованы пластификаторы, стабилизаторы, модификаторы скорости высвобождения ле-

карственного вещества, усилители проницаемости кожи для лекарственного вещества, адгезивы, полимеры, сополимеры, растворители, эмульгаторы и другие разрешённые к медицинскому применению вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. В фармакопейной статье или нормативной документации описывают форму трансдермального пластыря, цвет внешнего покровного слоя, матрицы и/или адгезива с указанием геометрических размеров площади подачи (высвобождения) действующего вещества с допустимыми отклонениями.

Растворение. Определяют скорость высвобождения действующего вещества из трансдермального пластыря или скорость его подачи через полимерную мембрану в выбранную среду растворения. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для трансдермальных пластырей».

Остаточные органические растворители. При использовании в производстве трансдермальных пластырей органических растворителей определяют их предельное содержание в лекарственном препарате согласно ОФС «Остаточные органические растворители».

Однородность массы. Для трансдермальных пластырей проводят определение однородности массы в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Если предусмотрено определение однородности дозирования, определение однородности массы не требуется.

Однородность дозирования. Для трансдермальных пластырей проводят определение однородности дозирования в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Количественное определение. Отклонение содержания действующего вещества/веществ в трансдермальном пластыре от заявленного не должно превышать $\pm 15\%$.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Каждый трансдермальный пластырь помещают в индивидуальную первичную упаковку.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На первичной упаковке указывают название и содержание действующего вещества в трансдермальном пластыре, количество подаваемого действующего вещества в единицу времени.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Эмульсии**ОФС.1.4.1.0017.15****Взамен ГФ X, ст. 239,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Эмульсии – жидкие лекарственные формы, представляющие собой гетерогенную двухфазную дисперсную систему с жидкой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой.

Эмульсии могут быть типа масло/вода и вода/масло.

Эмульсии предназначены для приема внутрь, ингаляций, местного, наружного и парентерального применения.

Эмульсии могут расслаиваться, но при взбалтывании должны легко восстанавливаться. Для обеспечения устойчивости в состав эмульсий вводят эмульгаторы.

Тип образующейся эмульсии определяется свойствами эмульгатора (его гидрофильно-липофильным балансом).

Эмульгаторы по типу образуемых эмульсий разделяются на гидрофильные (белки, слизи, крахмал, декстрин, сапонины, танин, растительные экстракты, соли желчных кислот, щелочные мыла, лецитин, полисорбаты и др.), образующие эмульсии типа масло/вода, и липофильные (мыла двух- и трехвалентных металлов, стерины, смоляные мыла, амиды жирных кислот, высокомолекулярные одноатомные спирты и др.), образующие эмульсии типа вода/масло.

Эмульсии бывают дозированные и недозированные.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

При получении эмульсий используют миндальное, персиковое, оливковое, подсолнечное, касторовое, вазелиновое и эфирные масла, а также рыбий

жир и другие несмешивающиеся с водой жидкости.

Выбор эмульгатора и его количество зависит от природы и свойств эмульгатора и масла.

Эмульсии получают диспергированием эмульгатора с эмульгируемой жидкостью и дисперсионной средой. Действующие вещества вводят в состав эмульсий с учетом их физико-химических свойств: липофильные вещества растворяют в маслах, водорастворимые – в воде, нерастворимые вещества диспергируют и вводят в основу эмульсии.

ИСПЫТАНИЯ

Эмульсии для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения». Эмульсии для ингаляций должны отвечать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций». Эмульсии в форме капель глазных должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Описание. Эмульсия должна представлять собой однородную жидкость, в которой может наблюдаться расслоение, исчезающее после взбалтывания. Указывают цвет и при необходимости – запах эмульсии.

pH. Определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Вязкость. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» для эмульсий в форме капель глазных, если в их состав входят вещества, увеличивающие вязкость; эмульсий для парентерального применения и эмульсий для ингаляций. Нормы указывают в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Размер частиц. Определяют, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Для эмульсий для внутрисосудистого введения контроль по показателю «Размер частиц» является обязательным (ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения»).

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Эмульсии выпускаются как в многодозовой, так и в однодозовой упаковке, снабженной при необходимости приспособлением, обеспечивающим удобство применения и дозирования лекарственного средства.

В качестве средства для отмеривания предписанной дозы в комплекте упаковки могут быть предусмотрены мерная ложка или стаканчик, капельница и др.

Эмульсии для парентерального применения, эмульсии в форме капель глазных и эмульсии для нанесения на поврежденную кожу выпускаются в стерильной герметичной упаковке.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На этикетке должна быть предусмотрена предупредительная надпись «Перед употреблением взбалтывать».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Не допускается замораживание.

Настои и отвары**ОФС.1.4.1.0018.15****Взамен ГФ X, ст. 349,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Настои и отвары – жидкие лекарственные формы, представляющие собой водные извлечения из лекарственного растительного сырья.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Настои и отвары получают из лекарственного растительного сырья, отвечающего требованиям соответствующих фармакопейных статей или нормативной документации. Для приготовления водных извлечений используют лекарственное растительное сырье: цельное, измельченное, порошок.

При приготовлении водных извлечений отдельные морфологические группы цельного лекарственного растительного сырья предварительно измельчают. Травы измельчают, как правило, до частиц размером не более 7 мм; листья и цветки – до частиц размером, как правило, не более 5 мм (кожистые листья – брусника, толокнянка и др. – до частиц размером не более 3 мм). Кора, корни, корневища должны иметь размер частиц, как правило, не более 3 мм. Плоды и семена используют преимущественно цельные, при необходимости измельчают до частиц размером не более 0,5 мм. Измельченность лекарственного растительного сырья должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации.

При получении водного извлечения лекарственное растительное сырье помещают в перфорированный инфундирный стакан, а затем в инфундирку, заранее нагретую на кипящей водяной бане в течение 15 мин, заливают водой комнатной температуры, взятой с учетом соответствующего

коэффициента водопоглощения, приведенного в ОФС «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья», закрывают крышкой и настаивают на кипящей водяной бане. Затем инфундирку снимают с водяной бани, выдерживают в течение определенного времени при комнатной температуре, после чего процеживают, отжимая остаток лекарственного растительного сырья, и добавляют воду до предписанного объема извлечения.

Объем воды, необходимый для приготовления требуемого количества водного извлечения, определяют суммированием требуемого объема извлечения и дополнительного количества воды, взятого с учетом коэффициента водопоглощения, для компенсации адсорбции жидкости сырьем. Дополнительное количество воды рассчитывают путем умножения прописанной массы лекарственного растительного сырья на коэффициент водопоглощения.

В случае отсутствия указаний для цветков, листьев, трав время настаивания на водяной бане составляет 15 мин, затем при комнатной температуре – 45 мин (режим настоя). Для коры, плодов, семян, почек, побегов, подземных органов время настаивания на водяной бане составляет 30 мин, при комнатной температуре – 10 мин (режим отвара).

При изготовлении водных извлечений объемом 1000 – 3000 мл время настаивания на водяной бане увеличивается на 10 мин и составляет 25 и 40 мин соответственно.

Для лекарственного растительного сырья, содержащего эфирное масло, время настаивания на водяной бане не зависит от морфологической группы сырья и составляет 15 мин, при комнатной температуре – 45 мин. При этом сосуд для настаивания должен быть плотно закупорен во избежание потерь терпеноидов эфирных масел.

Отвары из листьев толокнянки, брусники и всех видов лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества (кора дуба, корневища змеевика, корневища лапчатки, корневища и корни кровохлебки и

др.), процеживают немедленно после снятия инфундирки с водяной бани, не допуская охлаждения при комнатной температуре, чтобы избежать осаждения дубильных веществ на лекарственном растительном сырье.

Отвар из листьев сенны процеживают после полного охлаждения при комнатной температуре для осаждения смол.

При отсутствии дополнительных указаний соотношение лекарственного растительного сырья и воды при изготовлении водных извлечений должно составлять 1 : 10, т.е. из 10 массовых частей сырья получают 100 объемных частей водного извлечения.

При изготовлении водных извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего сильнодействующие и ядовитые вещества (например, травы термопсиса), при отсутствии дополнительных указаний следует брать 1 массовую часть лекарственного растительного сырья для получения 400 объемных частей водного извлечения (1 : 400).

Водные извлечения из травы горицвета, травы ландыша, побегов багульника, корневищ с корнями валерианы, корней истода готовят в соотношении 1 : 30.

Настой корней алтея готовят в соотношении 1 : 20. Для получения настоя корни алтея заливают водой комнатной температуры и настаивают в течение 30 мин при комнатной температуре при частом помешивании. После процеживания сырье не отжимают. Для получения требуемого объема водного извлечения следует использовать расходный коэффициент, который показывает, во сколько раз следует увеличить массу сырья и объем экстрагента, чтобы получить заданный объем извлечения необходимой концентрации. Величины расходного коэффициента приведены в ОФС «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья».

При получении водных извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего сильнодействующие или ядовитые биологически активные вещества (сердечные гликозиды, алкалоиды), применяют

лекарственное растительное сырье с определенной биологической активностью (ЛЕД) или с определенным процентным содержанием действующих веществ. Лекарственное растительное сырье с большей биологической активностью или большим содержанием действующих веществ берут в меньшем количестве, чем прописано, рассчитывая его по следующей формуле:

$$m = \frac{A \cdot B}{B} ,$$

где m – количество лекарственного растительного сырья, необходимое для изготовления водного извлечения, г;

A – прописанное количество лекарственного растительного сырья, г;

B – фактическое количество единиц действия в лекарственном растительном сырье или содержание биологически активных действующих веществ в 1 г сырья в %;

B – стандартное содержание единиц действия в лекарственном растительном сырье или содержание биологически активных действующих веществ в 1 г сырья в %.

При изготовлении водных извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего алкалоиды, добавляют лимонную, винную или хлористоводородную кислоту (в пересчете на хлористый водород). Кислоты берут по массе столько, сколько содержится алкалоидов во взятом количестве лекарственного растительного сырья.

Из лекарственных растительных препаратов в фильтр-пакетах готовят водные извлечения на один прием в соотношении, указанном в инструкции по применению. Для приготовления водного извлечения фильтр-пакет заливают кипящей водой в фарфоровой или керамической посуде с плотно закупоренной крышкой и настаивают в течение времени, указанного в инструкции по применению, но не менее 15 мин.

Водные извлечения могут быть изготовлены путем растворения в воде стандартизованных сухих или жидких экстрактов-концентратов, взятых в соответствующих количествах по отношению к лекарственному растительному сырию (1 : 1 или 1 : 2 и т.д.).

Водные извлечения могут быть также получены в режиме отвара с учетом коэффициента водопоглощения кипячением лекарственного растительного сырья с водой в течение 30 мин и более, после чего их процеживают. Отвары, как правило, готовят из лекарственного растительного сырья грубой морфологической структуры (корни, коры, корневища и т.д.). Готовый отвар процеживают сразу после кипячения.

В режиме отвара не следует готовить водные извлечения из лекарственного растительного сырья, содержащего летучие и термолабильные биологически активные вещества (эфирные масла, сердечные гликозиды и др.).

Для увеличения срока годности водных извлечений допускается добавление консервантов, например, сорбиновой кислоты.

ИСПЫТАНИЯ

Оценка качества осуществляется при изготовлении водного извлечения в аптечном учреждении, а также при технологическом процессе производства лекарственных растительных препаратов.

Описание. Отмечают цвет, запах, реже вкус водного извлечения (у водных извлечений из ядовитого и сильнодействующего лекарственного растительного сырья вкус не определяют).

pH водного извлечения. Определяют потенциометрически в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия».

Определение сухого остатка. 5 мл водного извлечения помещают в бюкс, взвешенный с точностью до 0,0001 г, выпаривают на водяной бане досуха и сушат в сушильном шкафу 2 ч при температуре $(102,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$, затем охлаждают в эксикаторе над кальция хлоридом безводным и взвешивают.

МАРКИРОВКА

На флаконах должны быть этикетки: «Хранить в прохладном месте», «Перед употреблением взбалтывать».

УПАКОВКА

В упаковке, обеспечивающей стабильность водного извлечения в течение срока годности.

ХРАНЕНИЕ

При температуре от 2 до 8 °С, в защищенном от света месте.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности водных извлечений – не более 2 сут, настоев алтея и других водных извлечений, содержащих полисахариды, – не более 1 сут, водных извлечений из чаги – не более 4 сут.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Настойки**ОФС.1.4.1.0019.15****Взамен ГФ X, ст. 684,
ст. ГФ XI, вып. 2**

Настойки – жидкая лекарственная форма, представляющая собой обычно окрашенные спиртовые или водно-спиртовые извлечения, получаемые из лекарственного растительного сырья (высушенного или свежего), а также из сырья животного происхождения без нагревания и удаления экстрагента.

Настойки подразделяют на простые, на основе одного вида лекарственного растительного сырья, и сложные (комплексные) – из смеси нескольких видов лекарственного сырья.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Настойки получают методом мацерации, перколяции или другим валидированным методом, используя в качестве экстрагента спирт этиловый в необходимой концентрации.

Из одной массовой части лекарственного растительного сырья получают 5 объемных частей настойки. Из одной массовой части лекарственного растительного сырья, содержащего алкалоиды и сердечные гликозиды, – 10 объемных частей настойки, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

После завершения процесса экстракции настойки отстаивают при температуре не выше 8 – 10 °С не менее 2 сут до получения прозрачной жидкости и фильтруют. В процессе хранения ряда настоек, главным образом комплексных, допускается образование незначительного осадка балластных ве-

ществ, при условии отсутствия в нем биологически активных веществ, по которым осуществляется стандартизация.

Настойки могут использоваться как лекарственные растительные препараты для внутреннего или наружного применения или входить в состав других лекарственных препаратов, например, эликсиров, капель для приема внутрь и др.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Настойки должны соответствовать по внешнему виду и запаху требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Плотность. Определение проводят, если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией в соответствии с требованиями ОФС «Плотность». Значение плотности должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах», если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации. Значение содержания спирта этилового должно быть указано в процентах и соответствовать пределам, установленным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Метанол и 2-пропанол. В настойках допускается содержание не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Сухой остаток. 5,0 мл настойки помещают в предварительно высушенную при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 5 см или бюкс, взвешенный с точностью до 0,0001 г, выпаривают на водяной бане досуха, сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре $(102,5 \pm 2,5)$ °С, охлаждают в эксикаторе (над безводным силикагелем, кальция хлоридом безводным или другим

подходящим осушителем) в течение 30 мин и взвешивают. Результат выражают в процентах. Содержание сухого остатка должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тяжелые металлы. 10 мл настойки выпаривают в фарфоровой чашке досуха на водяной бане, прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, осторожно сжигают и прокаливают при температуре 600 °С. К полученному остатку прибавляют при нагревании 5 мл насыщенного раствора аммония ацетата, фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл воды и доводят фильтрат водой до объема 100 мл; 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытания на тяжелые металлы (ОФС «Тяжелые металлы», метод 1). Допустимое содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,001 %.

Объем содержимого упаковки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Количественное определение. Содержание действующих биологически активных веществ или биологическую активность определяют с использованием валидированных методик и выражают в процентах или ЕД/мл.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы», во флаконах оранжевого стекла.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». На упаковке указывают количество исходного сырья в граммах и количество спирта этилового указанной концентрации, достаточное для получения 1 л настойки.

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». Хранят в защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сборы**ОФС.1.4.1.0020.15****Взамен ГФ X, ст. 628,
ст. ГФ XI, вып. 1**

Сборы лекарственные – смеси двух и более видов лекарственного растительного сырья различных способов переработки, возможно с добавлением субстанций минерального, синтетического, растительного и животного происхождения.

Сборы могут быть дозированными и недозированными и выпускаться в однодозовых или многодозовых упаковках.

Сборы предназначены как для наружного, так и для внутреннего применения. Они используются для приготовления водных извлечений, реже – в чистом виде, как присыпки, порошки для вдуваний или приема внутрь и др.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Лекарственное растительное сырье и субстанции, используемые для приготовления сборов, должны соответствовать требованиям соответствующих фармакопейных статей или нормативной документации.

Лекарственное растительное сырье, входящее в состав сборов, измельчают по отдельности. Измельченность сырья, входящего в состав сборов, используемого для получения настоев и отваров, должна соответствовать требованиям ОФС «Настои и отвары» и соответствующих фармакопейных статей или нормативной документации на лекарственное растительное сырье. Во всех случаях после измельчения лекарственного растительного сырья мелкие частицы в виде пыли отсеивают сквозь сито с

размером отверстий 0,18 мм.

При приготовлении сбора сырье, входящее в его состав, перемешивают до получения равномерной смеси. В тех случаях, когда в состав сбора входят водорастворимые субстанции, из них готовят насыщенный водный раствор и опрыскивают им сбор при перемешивании, после чего высушивают при температуре не выше 60 °С. Сырье гигроскопичное и легко портящееся при увлажнении следует прибавлять в сбор после процедуры опрыскивания и высушивания с последующим перемешиванием.

Эфирные масла и другие спирторастворимые субстанции вносят в сбор в виде раствора (1:10) в спирте 96 % путем опрыскивания при перемешивании.

В случае приготовления дозированного сбора его тщательно перемешивают во избежание расслоения.

В состав недозированных сборов не следует вводить лекарственное растительное сырье и субстанции, относящиеся к категории ядовитых или сильнодействующих.

ИСПЫТАНИЯ

Отбор проб для проведения анализа сборов проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Внешние признаки. *Сборы измельченные.* Из средней пробы измельченного сбора берут аналитическую пробу массой 10,0 г, помещают на чистую гладкую поверхность, проводят визуальный осмотр, фиксируя соответствие цвета, запаха сбора и, при необходимости, вкуса водного извлечения сбора требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации. Далее в пробе определяют компоненты сбора по внешнему виду, рассматривая их невооруженным глазом, а также с помощью лупы (10×) и стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Необходимо подтвердить морфологические признаки отдельных видов лекарственного растительного сырья, входящих в сбор, с указанием вида сырья.

Сборы-порошки. Из средней пробы сбора-порошка берут аналитическую пробу массой 10,0 г, помещают на чистую гладкую поверхность, проводят визуальный осмотр, фиксируя соответствие цвета, запаха сбора и вкуса водного извлечения сбора требованиям фармакопейных статей или нормативной документации.

В случае получения сборов из сырья других способов переработки (резано-прессованного и т.п.) проведение анализа внешних признаков описывается в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микроскопические признаки. Сборы подвергают микроскопическому анализу в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Сборы измельченные. Из аналитической пробы отбирают 25 – 30 однородных по внешнему виду частиц каждого компонента сбора и из нескольких кусочков готовят препараты, которые затем рассматривают под микроскопом для определения вида сырья.

При исследовании по основным признакам должны быть диагностированы все компоненты сбора, микрофотографии основных анатомо-диагностических признаков компонентов должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сборы-порошки. Часть аналитической пробы помещают на чистую гладкую поверхность и по внешним признакам выделяют составные компоненты сбора, рассматривая их невооруженным глазом и с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Для каждого компонента выбирают достаточное количество (но не менее 5) однородных по внешнему виду кусочков и из нескольких отобранных кусочков готовят микропрепараты по методике приготовления микропрепаратов из измельченного лекарственного растительного сырья. Отмечают наличие диагностических признаков, характерных для отдельных компонентов сбора. Микрофотографии основных анатомо-диагностических признаков

компонентов должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации.

В случае получения сборов из сырья других способов переработки проведение анализа микроскопических признаков должно быть описано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции.

Проводят в микропрепаратах компонентов сбора в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Из средней пробы берут аналитическую пробу массой 10 г для проведения качественных реакций, испытаний с помощью хроматографических и спектральных исследований.

Качественные реакции. Качественные реакции проводят непосредственно на компонентах сбора и/или с извлечением из сбора с указанием названия группы/групп биологически активных веществ или обнаруживаемых индивидуальных соединений по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации на лекарственное растительное сырье. Используемые реакции должны быть специфичными для биологически активных веществ компонентов сбора. При внесении в состав сбора различных субстанций природного, минерального и синтетического происхождения проводят их идентификацию с применением соответствующих качественных реакций.

Хроматография. Хроматографический анализ осуществляется с помощью различных хроматографических методик (ТСХ, ВЭЖХ и др.), позволяющих идентифицировать биологически активные вещества компонентов сбора, с использованием соответствующих стандартных образцов (отдельных биологически активных соединений). Для испытаний используют водное или водно-спиртовое извлечение из сбора, а также извлечения, полученные с помощью других подходящих растворителей, если

это указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спектр (УФ-спектр). Испытание проводят с извлечениями из сбора, если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

Для сборов из лекарственного растительного сырья различных способов переработки определяют:

- содержание биологически активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие извлечения из сбора, методы определения которых указаны в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации на лекарственное растительное сырье;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Однородность массы для дозированного и недозированного сбора. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями».

запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение биологически активных веществ (индивидуальных соединений или суммы веществ в пересчете на индивидуальное соединение), обуславливающих фармакологическое действие водного извлечения из сбора, проводят различными химическими, физико-химическими и другими валидованными методами. Методы определения (один или несколько) должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Экстракты

ОФС.1.4.1.0021.15

Взамен ГФ X, ст. 253,
ст. ГФ XI, вып. 2

Экстракты представляют собой концентрированные извлечения из лекарственного растительного сырья, реже из сырья животного происхождения.

По консистенции различают:

- экстракты сухие (*Extracta sicca*);
- экстракты густые (*Extracta spissa*);
- экстракты жидкие (*Extracta fluida*).

Экстракты сухие – порошкообразные массы, обладающие свойством сыпучести, с содержанием влаги не более 5 %.

Экстракты густые – вязкие массы с содержанием влаги не более 25 %.

Экстракты жидкие – густые, подвижные, иногда маслянистые жидкости.

Экстракты-концентраты – экстракты различной консистенции, стандартизованные по отношению к лекарственному растительному сырью в определенных соотношениях, например 1 : 1 или 1 : 2. Эти экстракты используются преимущественно для получения настоев и отваров, заменяя в указанных соотношениях лекарственное растительное сырье.

Для удобства применения разрешено получение растворов густых экстрактов в соотношении 1 : 2 к исходному экстракту. В качестве растворителя используют смесь, состоящую из 6 частей воды очищенной, 3 частей глицерина и 1 части спирта этилового. Срок хранения такого

раствора не должен превышать 15 сут.

По используемому экстрагенту различают:

- экстракты водные, полученные с использованием в качестве экстрагента воды очищенной;
- экстракты спиртовые, полученные с использованием в качестве экстрагента спирта этилового различных концентраций;
- экстракты масляные, полученные с использованием в качестве экстрагента растительного масла;
- экстракты, полученные с использованием различных органических растворителей (четырёххлористого углерода, дихлорэтана и др.);
- экстракты, полученные последовательным экстрагированием лекарственного растительного сырья экстрагентами, в том числе различной полярности.

По способу применения различают экстракты:

- для приема внутрь;
- для наружного применения.

Экстракты густые и сухие используются в качестве субстанции для производства/изготовления различных лекарственных препаратов, экстракты жидкие могут использоваться для производства/изготовления лекарственных препаратов и непосредственно в качестве лекарственного препарата.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Для получения экстрактов используют лекарственное растительное сырье, качество которого удовлетворяет требованиям фармакопейных статей или нормативной документации, и соответствующие экстрагенты.

В качестве одного из критериев оценки эффективности процесса экстракции может быть использован такой показатель, как «Экстрактивные вещества», определение которого в лекарственном растительном сырье осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Экстракты могут быть получены методами перколяции, реперколяции, мацерации, циркуляционной экстракции и другими подходящими валидированными методами.

Жидкие экстракты после завершения процесса экстрагирования следует обязательно выдерживать при температуре 8 – 10 °С в течение не менее 2 сут для осаждения балластных веществ, которые отделяют фильтрованием, и получения прозрачной жидкости.

В процессе хранения жидких экстрактов допускается образование незначительного осадка балластных веществ при условии отсутствия в нем биологически активных веществ.

При получении сухих и густых экстрактов их освобождают от балластных веществ добавлением к полученной вытяжке спирта этилового, адсорбентов, кипячением вытяжки и другими общепринятыми способами с последующим фильтрованием.

Очищенные извлечения сгущают выпариванием под вакуумом до требуемой консистенции (густые экстракты).

Сухие экстракты получают высушиванием густых экстрактов или непосредственно из очищенной вытяжки с использованием методов, обеспечивающих максимальное сохранение действующих веществ: распыление, лиофилизация, сублимация и др.

При получении экстрактов-концентратов их разбавляют до требуемого содержания действующих веществ, используя декстрин и другие вспомогательные вещества.

Гигроскопичность сухих экстрактов уменьшают добавлением к ним лактозы, аэросила и других вспомогательных веществ.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Указывают цвет и запах экстракта, при его наличии. При необходимости для жидких экстрактов отмечают наличие опалесценции, возможность образования осадка при хранении и др.

Потеря в массе при высушивании. Для экстрактов сухих и густых

определяют потерю в массе при высушивании в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Спирт этиловый. Для спиртосодержащих экстрактов проводят определение спирта этилового в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах».

Насыпной объем и гранулометрический состав. Сухие экстракты контролируют по показателю «Насыпной объем» в соответствии с требованиями ОФС «Степень сыпучести порошков», а также, если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией, по показателю «Гранулометрический состав» в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ». Нормы приводят в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации.

Тяжелые металлы. Все экстракты должны выдерживать требования по содержанию тяжелых металлов – не более 0,01 %, если иное не предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Сухой остаток. Для жидких экстрактов проводят определение сухого остатка по следующей методике: 5,0 мл жидкого экстракта помещают во взвешенный бюкс, выпаривают на водяной бане и сушат 3 ч при $(102,5 \pm 2,5)$ °С, затем охлаждают в эксикаторе в течение 30 мин и взвешивают. Содержание сухого остатка должно соответствовать требованиям, приведенным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Кислотное число, перекисное число, йодное число, число омыления. Если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией, для масляных экстрактов определяют кислотное число, перекисное число, йодное число, число омыления в соответствии с требованиями соответствующих ОФС.

Плотность. Для масляных экстрактов определяют плотность в

соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Растворимость. Если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией, для масляных экстрактов определяют растворимость в соответствии с требованиями ОФС «Растворимость».

Показатель преломления. Если предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией, для масляных экстрактов определяют показатель преломления в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Остаточные органические растворители. В случае использования при производстве экстрактов органических растворителей контролируют их остаточное содержание в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Масса (объем) содержимого упаковки. По массе (объему) содержимого упаковки экстракты должны соответствовать требованиям ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». В упаковке, обеспечивающей защиту от света, если иное не предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Для жидких экстрактов в случае возможности образования (при хранении) осадка, на этикетке указывают «Возможно образование осадка», «Перед употреблением взбалтывать».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Гранулы резано-прессованные

ОФС.1.4.1.0022.15

Вводится впервые

Гранулы резано-прессованные – лекарственная форма, представляющая собой кусочки цилиндрической, округлой или неправильной формы, полученные из лекарственного растительного сырья и предназначенные для получения водных извлечений.

Для производства гранул резано-прессованных могут использоваться только те виды лекарственного растительного сырья, в которых в процессе гранулирования не снижается количественное содержание биологически активных веществ.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Для производства гранул резано-прессованных используется измельченное лекарственное растительное сырье (измельченность устанавливается для каждого вида лекарственного растительного сырья индивидуально), которое подвергается в течение 3 – 4 мин увлажнению насыщенным паром (давление насыщенного пара 3,5 – 5,5 кг-сила/см²) при постоянном перемешивании (для равномерного распределения влаги). Далее увлажненное сырье поступает в прессовочную машину, откуда после продавливания увлажненной массы через сито с отверстиями размером 5 – 7 мм выходит в виде прессованных цилиндров длиной 10 – 30 мм, которые затем поступают в сушилку, охлаждаются за счет обдува воздухом, и далее подаются на вальцовую машину, где измельчаются до гранул.

ИСПЫТАНИЯ

Лекарственное растительное сырье, используемое для производства гранул резано-прессованных, должно соответствовать требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации на данный вид лекарственного растительного сырья.

Лекарственные растительные препараты в форме гранул резано-прессованных контролируют по показателям: «Описание», «Подлинность» – определяют макро- и микроскопические признаки, наличие основных групп биологически активных веществ; «Размер гранул»; «Потеря в массе при высушивании»; определяют содержание золы общей, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, примеси и др. в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая», ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте», ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; «Распадаемость»; «Масса содержимого упаковки»; «Количественное определение» – определяют содержание или биологическую активность основных групп биологически активных веществ. Испытания по показателям «Микробиологическая чистота», «Зараженность вредителями запасов», «Радионуклиды», «Тяжелые металлы», «Остаточные количества пестицидов» проводят в соответствии с требованиями соответствующих ОФС.

Описание. Указывают форму, цвет, запах гранул, определяют вкус водного извлечения (за исключением препаратов, произведенных из лекарственного растительного сырья, содержащего ядовитые и сильнодействующие вещества).

Размер гранул. Определяют с использованием ситового анализа и устанавливают следующие нормативные требования: гранул, не проходящих сквозь сито с требуемым размером отверстий, должно быть не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,18 мм, – не более 5 %, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной

документации.

Потеря в массе при высушивании. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Распадаемость. 10 – 12 гранул растительных помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды, нагретой до кипения. Кипятят на слабом огне, периодически взбалтывая содержимое колбы. Гранулы считаются распавшимися, если они полностью распались или превратились в рыхлую массу. Время распадаемости отсчитывают с момента прибавления кипящей воды. За результат принимают среднее значение трех определений. Время распадаемости устанавливают индивидуально для каждого лекарственного растительного препарата, но оно не должно превышать 5 мин.

Масса содержимого упаковки. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

Маркировка вторичной упаковки лекарственного растительного препарата должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Аэродинамическое распределение
мелкодисперсных частиц**

ОФС.1.4.2.0001.15
Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья описывает приборы и методы определения аэродинамического распределения частиц аэрозолей, формируемых при активации препаратов для ингаляций.

Допускается использование других приборов при условии соответствующей валидации методик.

СТЕКЛЯННЫЙ ИМПИНДЖЕР

Прибор изображен на рис. 1, спецификация компонентов прибора приведена в табл. 1.

Методика для жидких лекарственных форм для распыления

В верхнюю и нижнюю камеры помещают соответственно 7 и 30 мл растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Соединяют все части прибора, при этом прибор должен располагаться строго вертикально. Патрубок в нижней камере должен лишь касаться дна нижней камеры. Присоединяют насос, снабженный фильтром (размер пор фильтра указывают в фармакопейной статье или нормативной документации), к боковому адаптеру и пропускают через аппарат воздух. Скорость потока воздуха на входе в горловину устанавливают 60 ± 5 л/мин.

Вводят жидкое лекарственное средство для распыления в резервуар небулайзера. Надевают мундштук и соединяют с помощью адаптера со стеклянным импинджером.

Включают насос аппарата, а через 10 с – небулайзер. Через 60 с, если

нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, отключают небулайзер и через 5 с после этого выключают насос. Разбирают прибор и промывают внутреннюю поверхность верхней камеры растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Промывную жидкость собирают в мерную колбу. Затем промывают внутреннюю поверхность нижней камеры. Промывную жидкость собирают в другую мерную колбу. Промывают фильтр насоса и его соединение с нижней камерой, полученную промывную жидкость объединяют с промывной жидкостью, полученной при мытье нижней камеры. Определяют количественное содержание действующего вещества в каждой из 2 колб аналитическим методом, описанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Результаты выражают для каждой части прибора (верхней и нижней камеры) в процентах по отношению к заявленному содержанию действующего вещества.

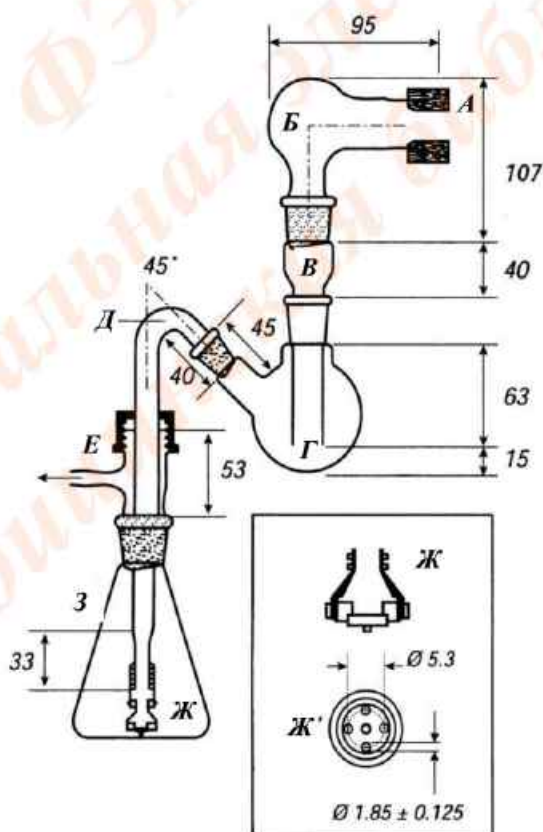


Рис. 1 – Стекланный импиджер

Размеры даны в мм. Допустимое отклонение ± 1 мм.

Таблица 1 – Спецификация компонентов стеклянного импинджера

Код	Компонент	Описание	Размеры*
А	Адаптер для мундштука	Резиновый адаптер для мундштука	
Б	Горловина	Модифицированная круглодонная колба:	50 мл
		– входное отверстие шлифованного стекла	29/32
		– выходное отверстие шлифованного стекла	24/29
В	Переходник из горловины отверстия в верхнюю камеру	Модифицированный стеклянный адаптер:	
		– входное отверстие шлифованного стекла	24/29
		– выходное отверстие шлифованного стекла	24/29
		Нижняя секция в виде стеклянной трубки диаметром	14
		Тонкостенная стеклянная трубка с внешним диаметром	17
Г	Верхняя камера	Модифицированная круглодонная колба:	100 мл
		– входное отверстие шлифованного стекла	24/29
		– выходное отверстие шлифованного стекла	24/29
Д	Соединительная трубка	Стеклянная трубка со стенками средней толщины:	
		– конусообразное отверстие	14/23
		Изогнутая секция и верхняя вертикальная секция с внешним диаметром	13
		Нижняя вертикальная секция с внешним диаметром	8
Е	Боковой резьбовой адаптер (к насосу)	Пластиковый наконечник винта	28/13
		Силиконовая прокладка	28/11
		Шайба из ПЭТФ	28/11
		Стеклянная резьба адаптера размером	28
		Выходное отверстие адаптера минимальным диаметром	5
Ж	Патрубок	Модифицированный полипропиленовый держатель фильтра, соединенный с нижней вертикальной секцией соединительной трубки с помощью соединителя из ПЭТФ	см. рис. 1
		Диск с 4 форсунками, расположенными на окружности диаметром 5,3 мм вокруг центральной форсунки:	10
		– диаметр	2
		– выступ	2
З	Нижняя камера	Коническая колба	250 мл
		– входное отверстие шлифованного стекла	24/29
* Размеры приведены в миллиметрах, если не обозначено иначе			

**Методика для аэрозолей
(дозированных ингаляционных лекарственных форм, находящихся под давлением)**

Адаптер для мундштука подсоединяют к горловине таким образом, чтобы мундштук, при его подсоединении к адаптеру на глубину около 10 мм, располагался выше горизонтальной оси горловины, а открытый конец мундштука, который соединен с испытуемым ингалятором, располагался выше остальных частей стеклянного импинджера.

В верхнюю и нижнюю камеры помещают соответственно 7 и 30 мл растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Соединяют все части прибора, при этом прибор должен располагаться строго вертикально. Патрубок в нижней камере должен лишь касаться дна нижней камеры. Присоединяют насос, снабженный фильтром (размер пор фильтра указывают в фармакопейной статье или нормативной документации), к боковому адаптеру и пропускают через аппарат воздух. Скорость потока воздуха на входе в горловину устанавливают 60 ± 5 л/мин.

Встряхивают испытуемый ингалятор в течение 5 с и, нажимая на дозирующий клапан, выпускают содержимое в воздух. Процедуру повторяют 3 раза, встряхивая каждый раз перед высвобождением в течение 5 с. Встряхивают в течение 5 с, соединяют мундштук и ингалятор с адаптером и сразу нажимают на дозирующий клапан, высвобождая дозу лекарственного средства. Отсоединяют ингалятор с мундштуком от адаптера, встряхивают в течение 5 с, вновь соединяют мундштук и ингалятор с адаптером и нажимают на дозирующий клапан. Повторяют описанную выше процедуру еще 8 раз. После десятого нажатия ожидают 5 с и отключают насос. Разбирают прибор. Промывают внутреннюю поверхность соединительной трубки растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Промывную жидкость собирают в нижней камере. Определяют количественное содержание действующего вещества в

полученном растворе аналитическим методом, описанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Результаты выражают в процентах по отношению к заявленному содержанию действующего вещества.

Методика для порошков для ингаляций

В верхнюю и нижнюю камеры помещают соответственно 7 и 30 мл растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Соединяют все части прибора, при этом прибор должен располагаться строго вертикально. Патрубок в нижней камере должен лишь касаться дна нижней камеры. Присоединяют насос, снабженный фильтром (размер пор фильтра указывают в фармакопейной статье или нормативной документации), к боковому адаптеру и пропускают через аппарат воздух. Скорость потока воздуха на входе в горловину устанавливают 60 ± 5 л/мин.

Ингалятор готовят к использованию, как указано в инструкции по медицинскому применению, и подсоединяют через адаптер к импиджеру. Включают насос на 5 с. Выключают насос и отсоединяют ингалятор. Повторяют описанную процедуру 9 раз. Разбирают прибор. Промывают внутреннюю поверхность соединительной трубки растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Промывную жидкость собирают в нижней камере. Определяют количественное содержание действующего вещества в полученном растворе аналитическим методом, описанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Результаты выражают в процентах по отношению к заявленному содержанию действующего вещества.

КАСКАДНЫЙ ИМПАКТОР АНДЕРСЕНА

Каскадный импактор Андерсена состоит из 8 ступеней с отверстиями и улавливающими пластинами и фильтра. Изготовлен из материала, инертного для компонентов лекарственной формы, например: алюминий, нержавеющая сталь, титан. Ступени соединены между собой и герметизированы

уплотнительными кольцами. Размеры и количества отверстий на ступенях приведены в табл. 2. В конфигурации, используемой для анализа аэрозолей (рис. 2), входной конус (1) соединен с прямоугольным входным портом (2). В конфигурации, используемой для анализа порошков для ингаляций, может быть применен пресепаратор (рис. 3), который располагают между верхней ступенью импактора и входным портом для сбора нереспирабельной фракции порошка. Для обеспечения герметичности соединения мундштука ингалятора и входного порта используют специальный резиновый адаптер, который должен соответствовать по форме и размерам мундштуку испытуемого ингалятора.

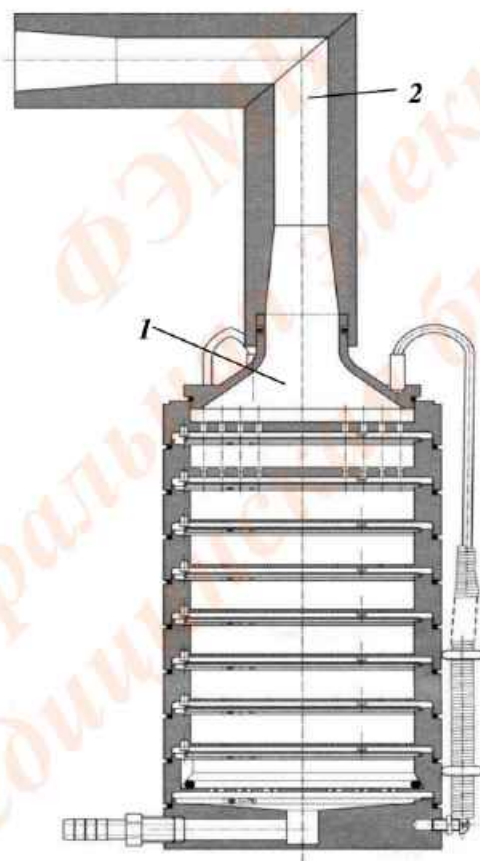


Рис. 2 – Каскадный импактор Андерсена в конфигурации для анализа аэрозолей

Таблица 2 – Размеры и количество отверстий в каскадном импакторе Андерсена

Ступень	Количество отверстий	Диаметр отверстий, мм
0	96	$2,550 \pm 0,025$
1	96	$1,890 \pm 0,025$
2	400	$0,9140 \pm 0,0127$
3	400	$0,7110 \pm 0,0127$
4	400	$0,5330 \pm 0,0127$
5	400	$0,3430 \pm 0,0127$
6	400	$0,2540 \pm 0,0127$
7	201	$0,2540 \pm 0,0127$

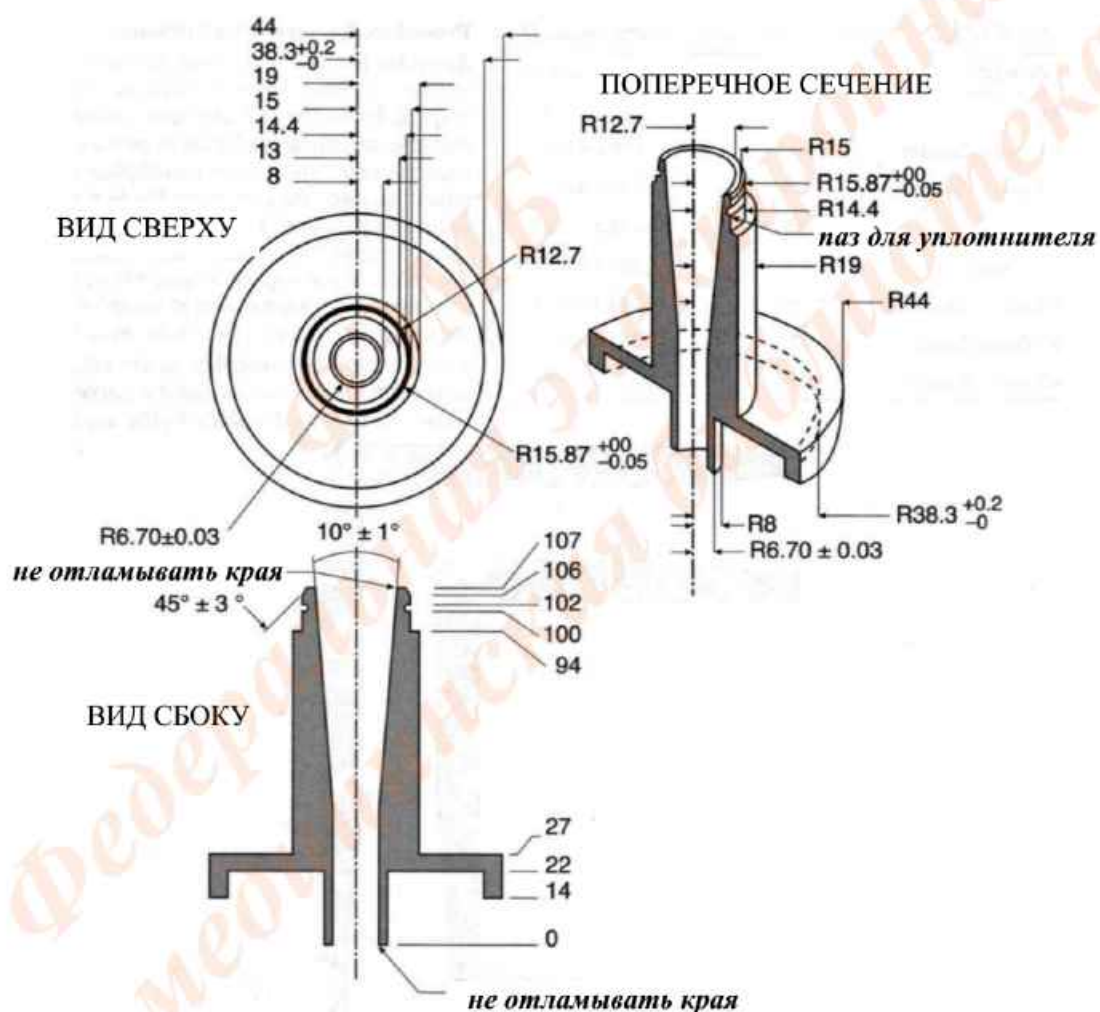


Рис. 3 – Пресепаратор для каскадного импактора Андерсена

За исключением обозначенных мест (не отламывать края), все кромки и шероховатости должны быть удалены. Поверхность должна быть гладкой. Внутренний канал должен быть отшлифован до чистоты около 0,4 мкм. Размеры уплотнителя: внутренний диаметр 29 мм, внешний диаметр 32 мм, ширина 1,8 мм. Размеры даны в мм, если не обозначено иначе

**Методика для аэрозолей
(дозированных ингаляционных лекарственных форм,
находящихся под давлением)**

Помещают соответствующий фильтр на нижнюю ступень, собирают импактор, проверяют систему на герметичность, следуя инструкциям производителя. Адаптер закрепляют на входном порте таким образом, чтобы конец мундштука испытуемого ингалятора находился на одном уровне с горизонтальной осью входного порта, а сам ингалятор был ориентирован в рабочую позицию согласно инструкции по применению (как правило, вертикально). Насос соединяют с выходным отверстием прибора и устанавливают скорость потока воздуха на входе $28,3 \pm 1,5$ л/мин. Насос отключают.

Если нет других указаний в инструкции по применению, встряхивают ингалятор в течение 5 с и высвобождают одну дозу в воздух. Включают насос, вставляют мундштук в адаптер и производят выпуск дозы в импактор. Отсоединяют ингалятор от адаптера, встряхивают и вновь производят выпуск дозы в импактор. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос. Разбирают прибор. Отсоединяют входной порт, адаптер и мундштук, промывают их растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Аккуратно извлекают фильтр и улавливающие пластины, промывают их определенными порциями растворителя, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респирабельную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика для порошков для ингаляций

Поскольку аэродинамические характеристики отдельных ступеней каскадного импактора Андерсена откалиброваны для использования скорости потока воздуха 28,3 л/мин, а при определении респираторной фракции в порошках для ингаляций не предполагается обязательного соблюдения указанной скорости потока воздуха, необходимо валидировать и обосновывать использование импактора в условиях, предполагающих установку скорости потока, отличную от 28,3 л/мин.

Помещают соответствующий фильтр на нижнюю ступень, собирают импактор и проверяют систему на герметичность, следуя инструкциям производителя. Использование пресепаратора оговаривается в фармакопейной статье или нормативной документации. Если в фармакопейной статье или нормативной документации имеются соответствующие указания, некоторые ступени могут не использоваться. Для обеспечения эффективного поглощения частиц каждую пластину и пресепаратор допускается смазывать глицерином или аналогичной нелетучей, относительно инертной жидкостью с высокой вязкостью.

Соединяют импактор с системой регулирования потока, как указано на рис. 4 и описано в табл. 3.

Если нет других указаний, пропускают через прибор с подсоединенным ингалятором 4 л воздуха со скоростью потока ($Q_{исх}$), использовавшейся при определении однородности дозирования.

Подсоединяют измеритель скорости потока к входному отверстию системы. Для измерения скорости исходящего потока используют либо измеритель скорости потока, откалиброванный для потока, исходящего из измерительного прибора, либо, в случае использования прибора, откалиброванного на измерение скорости входящего потока ($Q_{вх}$), рассчитывают скорость исходящего потока ($Q_{исх}$) по закону идеального газа:

$$Q_{исх} = \frac{Q_{вх} \cdot P_0}{P_0 - \Delta P}, \quad (1)$$

где P_0 – атмосферное давление, мм рт.ст.;

ΔP – перепад давления в измерительном приборе, мм рт.ст.

Устанавливают регулирующий клапан таким образом, чтобы достичь постоянной скорости потока через систему, $Q_{исх} (\pm 5 \%)$. Определяют время, в течение которого 4 л воздуха проходят через ингалятор. При присоединенном ингаляторе измеряют абсолютное давление с обеих сторон регулирующего клапана (точки замера **P2** и **P3**, рис. 4). Соотношение $P3/P2$ должно составлять $\leq 0,5$, в противном случае, производят увеличение мощности насоса и повторяют измерения.

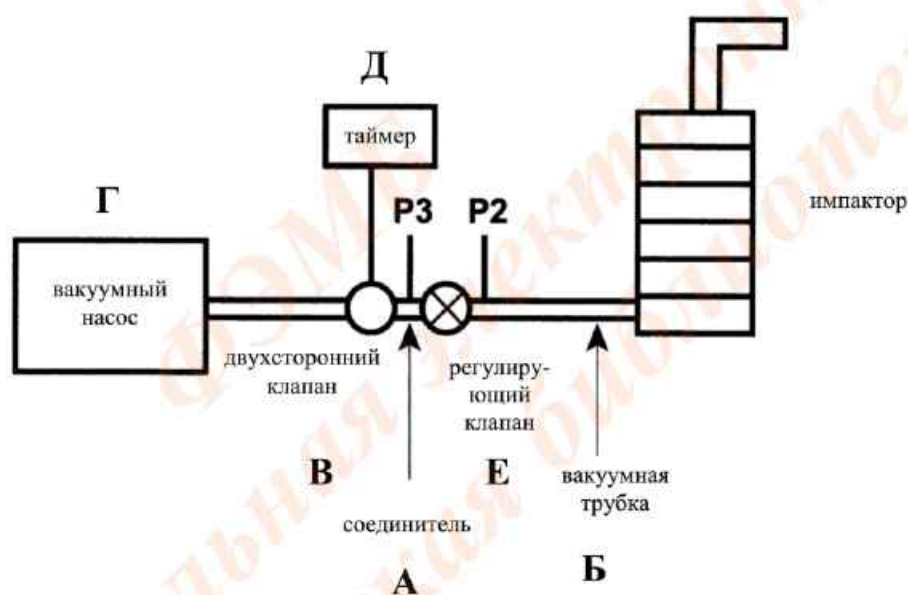


Рис. 4 – Система регулирования воздушного потока

Таблица 3 – Описание системы регулирования воздушного потока

Код	Устройство	Описание
А	Соединитель	Внутренний диаметр ≥ 8 мм, например, короткая металлическая муфта с отводом к P3 меньшего диаметра
Б	Вакуумная трубка	Трубка $\geq 8 \pm 0,5$ мм (внутренний диаметр), достаточной длины для внутреннего объема 25 ± 5 мл, например, силиконовая
В	Двухсторонний клапан	Двухсторонний, двухпортовый электромагнитный клапан, имеющий минимальное сопротивление воздушному потоку, с внутренним диаметром ≥ 8 мм, и временем реакции ≤ 100 мс
Г	Вакуумный насос	Насос должен обеспечивать достаточную скорость воздушного потока через собранную систему. Насос соединяют с двухсторонним клапаном с помощью вакуумной трубки (внутренний диаметр ≥ 10 мм)

Д	Таймер	Таймер, способный регулировать двухсторонний клапан в течение необходимого времени
P2 P3	Измерители давления	Измерители абсолютного давления
Е	Регулирующий клапан	Клапан, регулирующий воздушный поток с максимальным значением $C_v \geq 1$

Готовят порошковый ингалятор, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации или в инструкции по медицинскому применению. При включенном насосе и закрытом двустороннем клапане вставляют мундштук ингалятора в адаптер. Высвобождают порошок в прибор, открыв клапан на необходимое время $T (\pm 5 \%)$. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос. Разбирают прибор. Отсоединяют пресепаратор, адаптер и мундштук, промывают их растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Аккуратно извлекают фильтр и улавливающие пластины, промывают их порциями растворителя, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респирабельную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

МНОГОУРОВНЕВЫЙ ЖИДКОСТНОЙ ИМПИНДЖЕР

Многоуровневый жидкостной импинджер состоит из 5 ступеней: 1 (пресепаратор), 2, 3 и 4 (основные ступени) и 5 (ступень фильтра) (см. рис. 5-7, табл. 4, 5). Ступени, на которых производится сбор лекарственного средства, должны поддерживаться во влажном состоянии в отличие от каскадного импактора Андерсена. Ступень 1 состоит из верхней

горизонтальной металлической перегородки (Б), через которую проходит входное отверстие трубки (А) с улавливающей пластиной (Г); стеклянного цилиндра (Д) с отверстием для отбора проб (Е), образующего вертикальную стенку ступени; нижней горизонтальной металлической перегородки (Ж), через которую трубка (З) соединяется со следующей ступенью. Трубка (Х) ступени 4 заканчивается насадкой с набором форсунок. Улавливающая пластинка (Г) крепится к металлической рамке (К), которая подсоединена двумя проволоками (Л) к втулке (М), соединенной с трубкой. Горизонтальная поверхность улавливающей пластинки перпендикулярна оси распылителя и расположена по центру. Верхняя поверхность уплотняющей пластинки немного приподнята над краем металлической рамы. Выемка по периметру горизонтальной стенки предназначена для стеклянного цилиндра. Стеклянные цилиндры напротив горизонтальных стенок закрыты сальником (Н) и скреплены между собой 6 болтами (О). Отверстия для отбора проб закрыты пробками. Дно нижней стенки ступени 4 имеет концентрический выступ с резиновым уплотнительным кольцом (Р), которое обеспечивает герметичное примыкание краев фильтра к держателю фильтра. Держатель фильтра (Т) выполнен в виде резервуара с концентрическим углублением, в котором плотно установлена перфорированная опора для фильтра (У). Держатель фильтра имеет размер, предусматривающий использование фильтров диаметром 76 мм. Конструкция, включающая все ступени, зафиксирована на держателе фильтра двумя зажимами (Ф).

Входной порт (рис. 8) под прямым углом соединен с входным отверстием трубки первой ступени импинджера. Резиновое уплотнительное кольцо распылителя обеспечивает герметичность соединения с входным портом. Для обеспечения герметичности соединения мундштука ингалятора и входного порта используют специальный резиновый адаптер, который должен соответствовать по форме и размерам мундштуку испытуемого ингалятора.

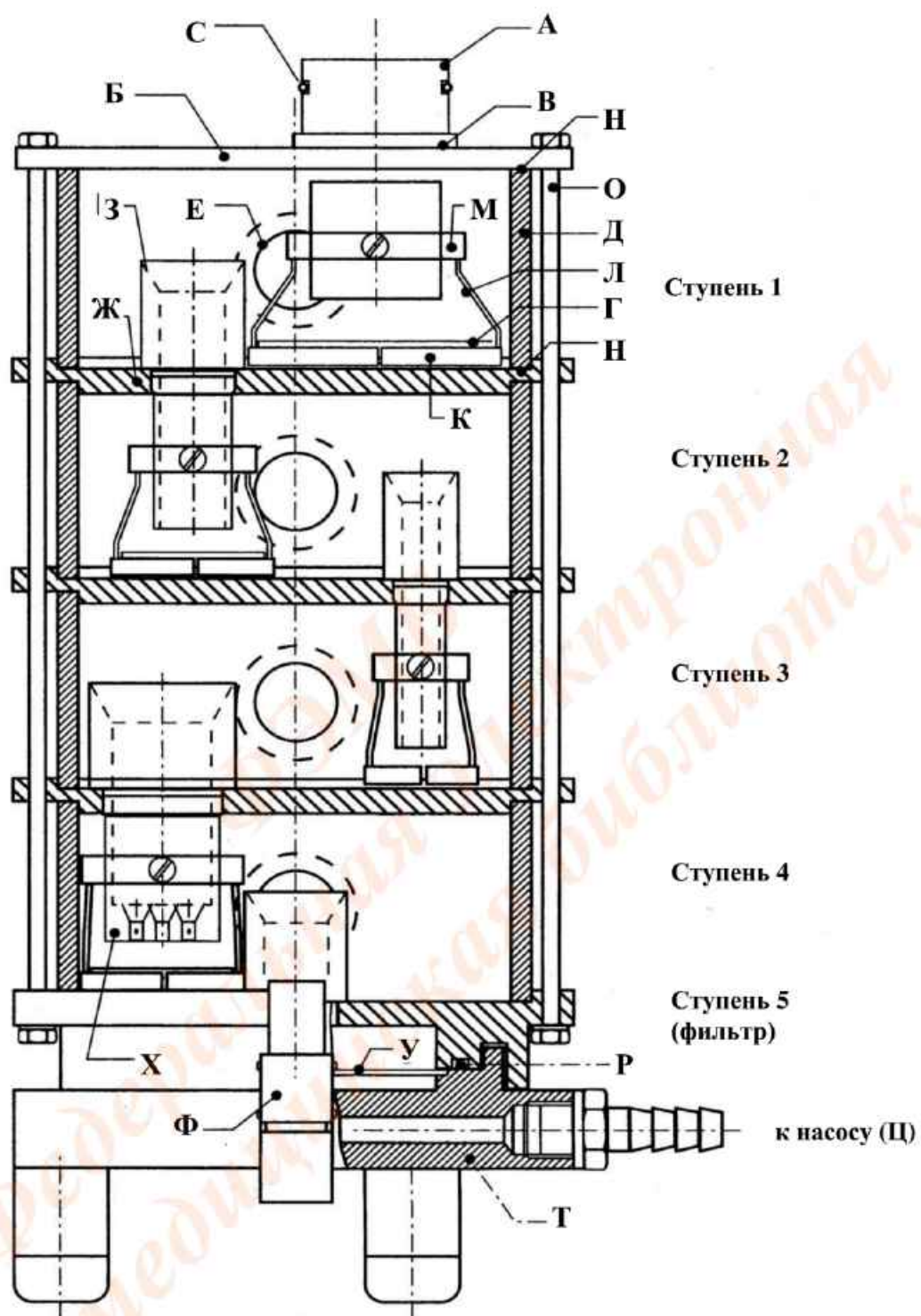


Рис. 5 – Многоуровневый жидкостной импиджер

Таблица 4 – Спецификация компонентов многоуровневого жидкостного импинджера (см. рис. 5)

Код	Компонент	Описание	Размеры*
А, З	Трубка	Металлическая трубка, проходящая через разделительную перегородку с прокладкой (В), с полированной внутренней поверхностью	см. рис. 6
Б, Ж	Разделительная перегородка	Круглая металлическая пластина диаметром	120
		– <i>толщина</i>	см. рис. 6
В	Прокладка	Например, из ПЭТФ	должна подходить к трубке
Г	Улавливающая пластина	Пористый круглый диск из тугоплавкого стекла	-
		– <i>диаметр</i>	см. рис. 6
Д	Стекланный цилиндр	Стекланная трубка с ровными полированными поверхностями	-
		– <i>высота вместе с прокладками</i>	46
		– <i>внешний диаметр</i>	100
		– <i>толщина стенок</i>	3,5
		– <i>диаметр отверстия для отбора пробы (Е)</i>	18
		– <i>крышка отверстия для отбора пробы</i>	ISO 24/25
К	Металлическая рамка	L-образная круговая рамка с щелью	-
		– <i>внутренний диаметр</i>	должен подходить к улавливающей пластине
		– <i>высота</i>	4
		– <i>толщина горизонтальной секции</i>	0,5
		– <i>толщина вертикальной секции</i>	2
Л	Проволока	Стальная, соединяющая металлическую рамку и втулку (два для каждой рамки)	-
		– <i>диаметр</i>	1
М	Втулка	Металлическая втулка, закреплённая на трубке резьбовым соединением	-
		– <i>внутренний диаметр</i>	должен подходить к трубке
		– <i>высота</i>	6
		– <i>толщина</i>	5
Н	Сальник	Прокладка, например, силиконовая	должна подходить к стеклянному цилиндру
О	Болт	Металлический болт с гайкой (6 пар) длиной	205
		– <i>диаметр</i>	4
Р	Уплотнительное кольцо	Каучуковое уплотнительное кольцо, диаметр × толщина	66,34 × 2,62

Код	Компонент	Описание	Размеры*
С	Уплотнительное кольцо	Каучуковое уплотнительное кольцо, диаметр × толщина	29,1 × 1,6
Т	Держатель фильтра	Металлический кожух со штативом и выходным отверстием	см. рис. 7
У	Опора для фильтра	Перфорированная листовая сталь, диаметр	65
		– размер отверстий	3
		– расстояние между отверстиями (по центру)	4
Ф	Зажимы	Замки с пружинным механизмом	-
Х	Трубка с набором форсунок	Трубка (З), заканчивающаяся насадкой с набором форсунок	см. рис. 6
Ц	Выходное отверстие	Выходное отверстие с патрубком для присоединения к насосу	Внутренний диаметр ≥ 10

* Размеры приведены в мм, если не обозначено иначе

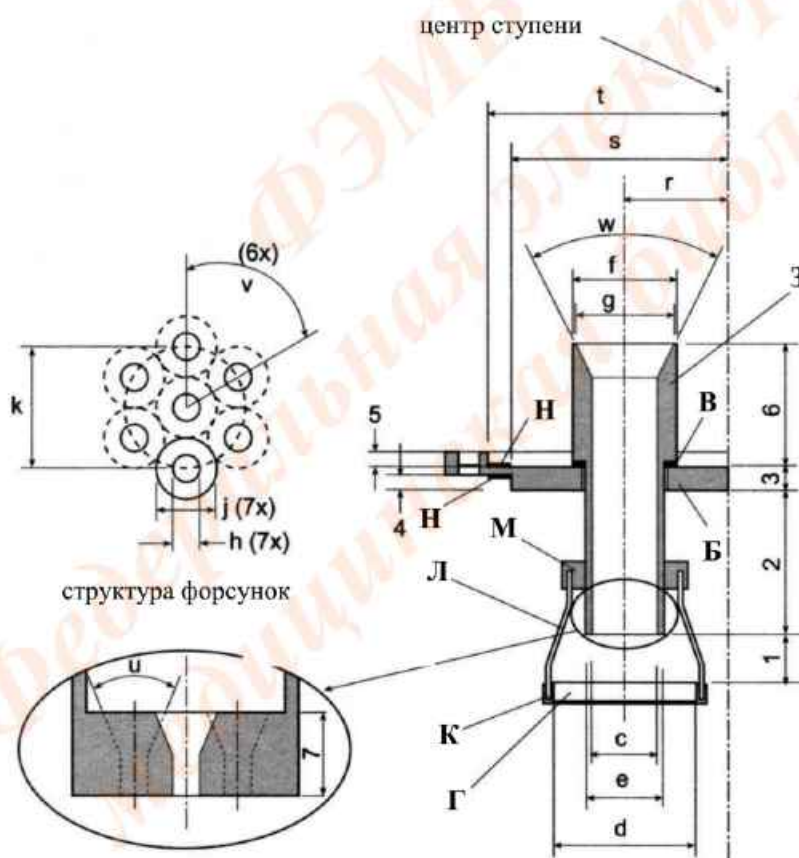


Рис. 6 – Детальная схема трубок и улавливающих пластин
На вставках представлена насадка с набором форсунок.

Таблица 5 – Размеры¹ трубок и улавливающих пластин (см. рис. 6)

Тип	Код ²	Ступень 1	Ступень 2	Ступень 3	Ступень 4	Фильтр (ступень 5)
Расстояние, мм	1	9,5 (-0,0; +0,5)	5,5 (-0,0; +0,5)	4,0 (-0,0; +0,5)	6,0 (-0,0; +0,5)	-
Расстояние, мм	2	26	31	33	30,5	0
Расстояние, мм	3	8	5	5	5	5
Расстояние, мм	4	3	3	3	3	-
Расстояние, мм	5	0	3	3	3	3
Расстояние, мм	6 ³	20	25	25	25	25
Расстояние, мм	7	-	-	-	8,5	-
Диаметр, мм	c	25	14	8,0 (±0,1)	21	14
Диаметр, мм	d	50	30	20	30	-
Диаметр, мм	e	27,9	16,5	10,5	23,9	-
Диаметр, мм	f	31,75 (-0,0; +0,5)	22	14	31	22
Диаметр, мм	g	25,4	21	13	30	21
Диаметр, мм	h	-	-	-	2,70 (±0,5)	-
Диаметр, мм	j	-	-	-	6,3	-
Диаметр, мм	k	-	-	-	12,6	-
Радиус ⁴ , мм	r	16	22	27	28,5	0
Радиус, мм	s	46	46	46	46	-
Радиус, мм	t	-	50	50	50	50
Угол, °	w	10	53	53	53	53
Угол, °	u	-	-	-	45	-
Угол, °	v	-	-	-	60	-

¹ допустимые отклонения, при отсутствии указаний, по ISO 2768-m;
² см. рис. 6;
³ включая уплотнительное кольцо;
⁴ относительно центра ступени.

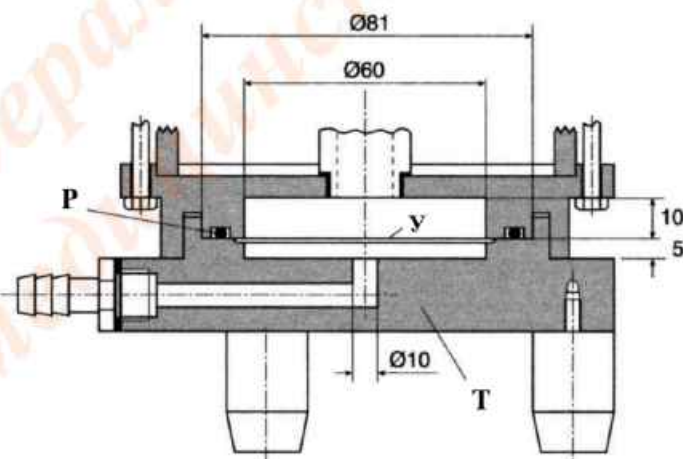
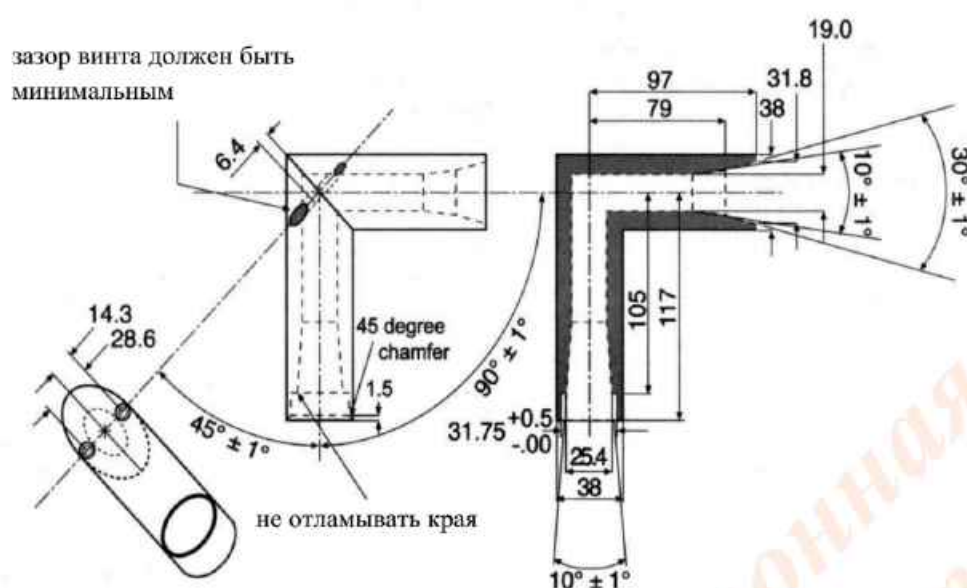
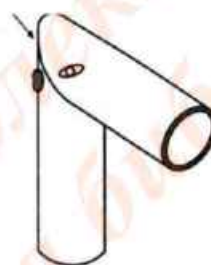


Рис. 7 – Детальное изображение держателя фильтра. Спецификации компонентов приведены в табл. 4. Размеры приведены в мм



сечение должно быть герметичным



изометрическое изображение

Рис. 8 – Детальное изображение входного порта
Размеры приведены в мм, если не обозначено иначе

Методика для аэрозолей (дозированных ингаляционных лекарственных форм, находящихся под давлением)

По 20 мл растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в ступени 1 – 4, закрывают пробками. Наклоняют аппарат, чтобы смочить пробки для нейтрализации электростатического заряда. Устанавливают фильтр в держатель на ступени 5, собирают прибор. Адаптер закрепляют на входном порте таким образом, чтобы конец мундштука испытуемого ингалятора находился на

одном уровне с горизонтальной осью входного порта, а сам ингалятор был ориентирован в рабочую позицию согласно инструкции по медицинскому применению (как правило, вертикально). К выходному отверстию присоединяют вакуумный насос и устанавливают скорость потока воздуха через прибор $30 \pm 1,5$ л/мин на входе. Выключают насос.

Если нет других указаний в инструкции по применению, встряхивают ингалятор в течение 5 с и выпускают одну дозу в воздух. Включают насос, вставляют мундштук в адаптер и выпускают одну дозу в импинджер. Отсоединяют ингалятор от адаптера. Повторяют процедуру. Количество выпусков должно быть минимальное, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего опорожнения отключают насос. Отсоединяют ступень 5 прибора. Аккуратно извлекают фильтр и промывают растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Отсоединяют входной порт и адаптер от прибора, также промывают растворителем. При необходимости ополаскивают внутреннюю поверхность трубки ступени 1 растворителем, позволяя растворителю стечь. Омывают внутренние стенки, осторожно поворачивая прибор. Следят, чтобы жидкость не проникала из одной ступени в другую. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респираторную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика для порошков для ингаляций

Помещают фильтр на нижнюю ступень, собирают импинджер. Подсоединяют прибор к системе регулирования потока (см. рис. 4 и табл. 3). Если нет других указаний, пропускают через прибор с подсоединенным

ингалятором 4 л воздуха со скоростью потока ($Q_{исх}$), использовавшейся при определении однородности дозирования. Проводят калибровку скорости потока воздуха, как описано для каскадного импактора Андерсена.

По 20 мл растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в ступени 1 – 4, закрывают пробками. Наклоняют аппарат, чтобы смочить пробки для нейтрализации электростатического заряда. Закрепляют адаптер на входном порте.

Готовят порошковый ингалятор в соответствии с инструкцией по применению. При включенном насосе и закрытом двустороннем клапане вставляют мундштук ингалятора в адаптер. Высвобождают порошок в прибор, открыв клапан на время $T (\pm 5 \%)$, необходимое для пропускания 4 л воздуха при заданной скорости потока. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос.

Отсоединяют ступень 5 прибора. Аккуратно извлекают фильтр и промывают растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Отсоединяют входной порт и адаптер от прибора, и также промывают растворителем. При необходимости ополаскивают внутреннюю поверхность трубки ступени 1 растворителем, позволяя растворителю стечь. Омывают внутренние стенки, осторожно поворачивая прибор. Следят, чтобы жидкость не проникала из одной ступени в другую. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респирабельную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

КАСКАДНЫЙ ИМПАКТОР НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Устройство каскадного импактора нового поколения показано на рис. 9 – 13. Входной порт, используемый для соединения с ингалятором, показан на рис. 8. Прибор представляет собой семиступенчатый каскадный импактор с терминальным микродиафрагменным сборником (МДС). Прибор предназначен для работы со скоростями потока воздуха от 30 до 100 л/мин. Изготовлен из материала, инертного для компонентов лекарственной формы, например: алюминия, нержавеющей стали, титана.

Импактор имеет съёмные улавливающие чашки, расположенные в одной плоскости, и состоит из 3 основных частей: нижнего корпуса, в котором установлены улавливающие чашки; герметизирующего корпуса, в котором установлены форсунки; крышки с межступенчатыми каналами (рис. 9 – 12). Все ступени, кроме первой, имеют набор форсунок (рис. 12). Поток воздуха через импактор носит пилообразный характер.

Спецификация ступеней представлена в табл. 6.

При выполнении исследований герметизирующий корпус и крышка скреплены друг с другом в один блок. Доступ к улавливающим чашкам возможен только после завершения испытания ингалятора, когда этот блок открыт. Чашки закрепляются в общем поддоне таким образом, чтобы их можно было извлечь из импактора только при поднятии блока.

Таблица 6 – Спецификация ступеней импактора нового поколения

Описание	Размер, мм
Пресепаратор (размер <i>a</i> на рис. 13)	$12,80 \pm 0,05$
Ступень 1 (рис. 12). Диаметр форсунки	$14,30 \pm 0,05$
Ступень 2 (рис. 12). Диаметр форсунки	$4,88 \pm 0,04$
Ступень 3 (рис. 12). Диаметр форсунки	$2,185 \pm 0,02$
Ступень 4 (рис. 12). Диаметр форсунки	$1,207 \pm 0,01$
Ступень 5 (рис. 12). Диаметр форсунки	$0,608 \pm 0,01$
Ступень 6 (рис. 12). Диаметр форсунки	$0,323 \pm 0,01$
Ступень 7 (рис. 12). Диаметр форсунки	$0,206 \pm 0,01$
Микродиафрагменный сборник (рис. 12)	около 0,070
Глубина чашки (размер <i>b</i> на рис. 11)	$14,625 \pm 0,10$
Шероховатость поверхности чашек для сбора	0,5 – 2 мкм
Ступень 1. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$0 \pm 1,18$

Описание	Размер, мм
Ступень 2. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$5,236 \pm 0,736$
Ступень 3. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$8,445 \pm 0,410$
Ступень 4. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$11,379 \pm 0,237$
Ступень 5. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$13,176 \pm 0,341$
Ступень 6. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$13,999 \pm 0,071$
Ступень 7. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	$14,000 \pm 0,071$
Микродиафрагменный сборник. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер <i>в</i> на рис. 11)	14,429 - 14,571

Входной порт с внутренними размерами, указанными на рис. 8, присоединён к входной трубке импактора. При испытании порошков для ингаляций для предотвращения перегрузки ступени 1 может быть использован пресепаратор, который устанавливается между входным портом и импактором. Использование пресепаратора оговаривается в фармакопейной статье или нормативной документации. Переходник должен обеспечивать плотное соединение мундштука и открытого конца входного порта.

Терминальный микродиафрагменный сборник (МДС) при испытании многих лекарственных форм позволяет исключить использование конечного фильтра, что должно быть определено при валидации метода, используемого в фармакопейной статье или нормативной документации. МДС состоит из уплотнительной пластины с форсунками и чашки для сбора. В случае испытания лекарственных форм со значительной долей частиц, которую невозможно уловить в МДС, может быть предусмотрено использование дополнительного держателя фильтра конечной очистки (предпочтительно стекловолоконного), который используется либо вместо МДС, либо после МДС.

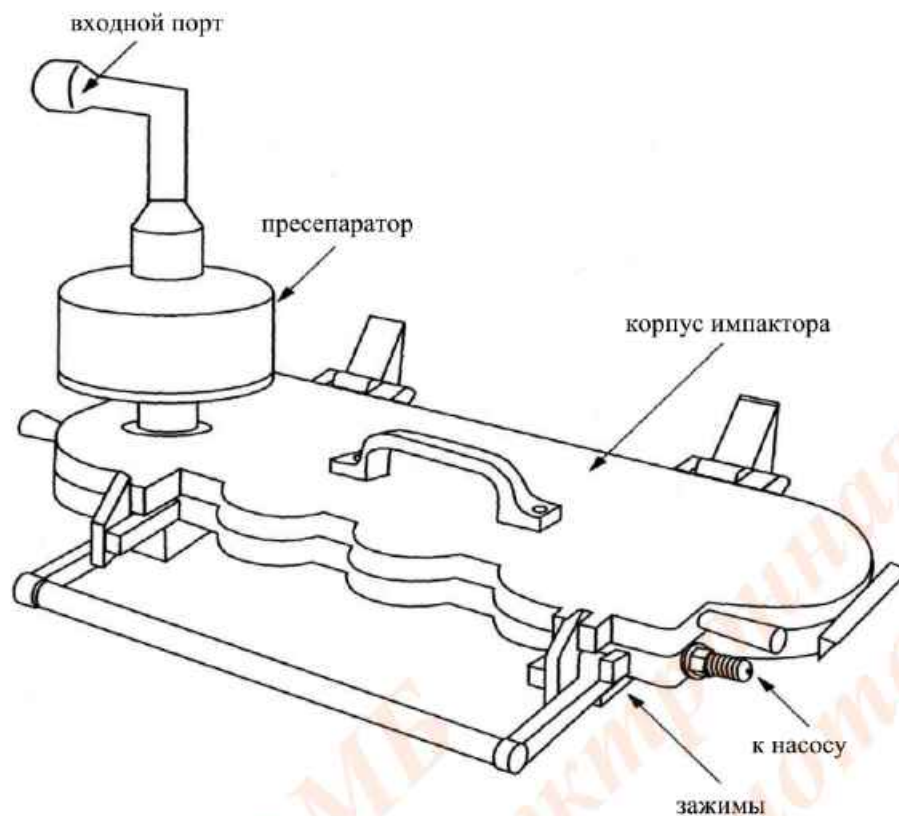


Рис. 9 – Общий вид каскадного импактора нового поколения (с пресепаратором)

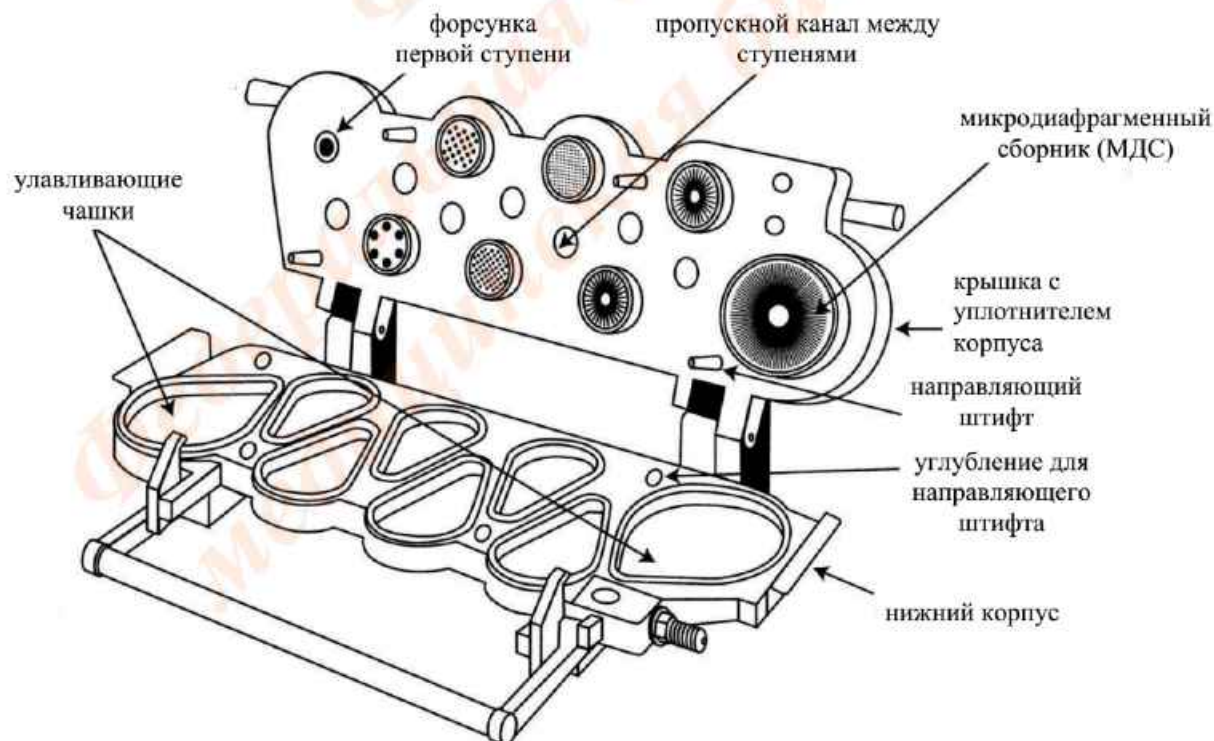


Рис. 10 – Общий вид каскадного импактора нового поколения с компонентами

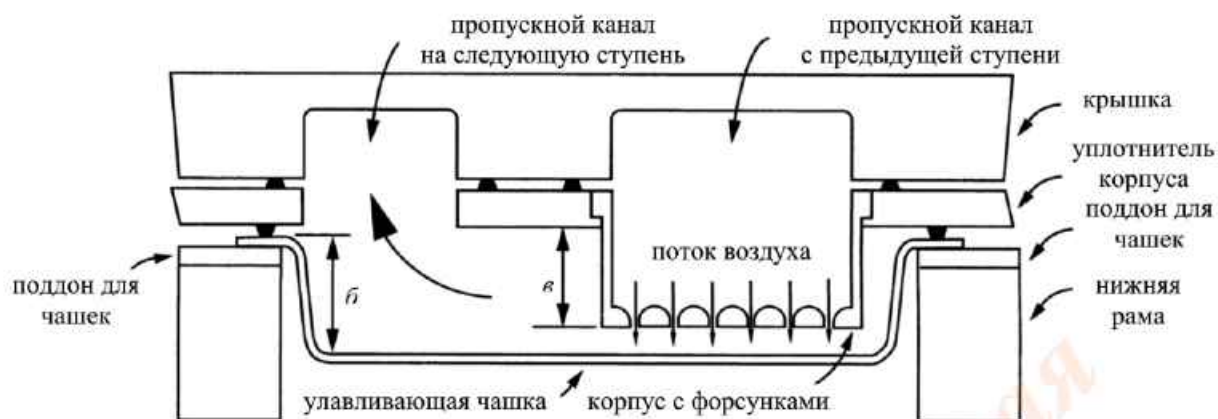


Рис. 11 – Схема межступенчатых каналов каскадного импактора нового поколения

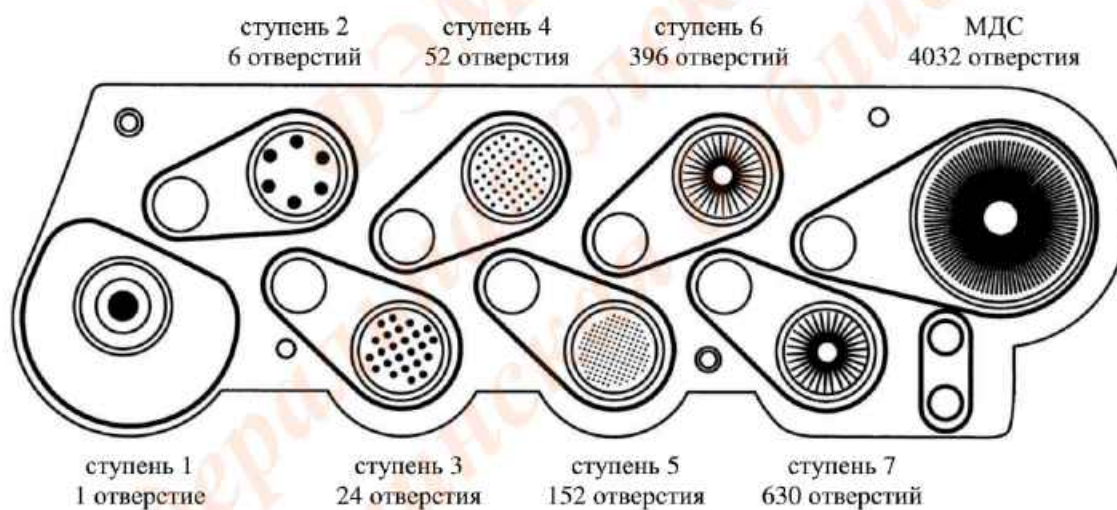


Рис. 12 – Конфигурация форсунок импактора нового поколения

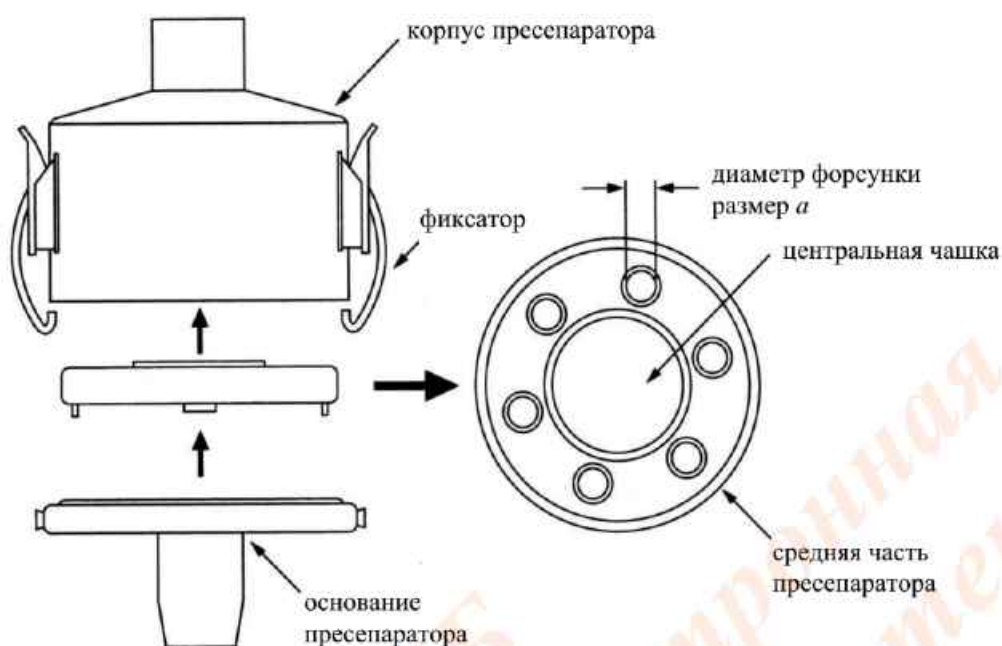


Рис. 13 – Пресепаратор для каскадного импактора нового поколения

Методика для аэрозолей (дозированных ингаляционных лекарственных форм, находящихся под давлением)

Собирают прибор без пресепаратора. Помещают улавливающие чашки в соответствующие гнезда поддона. Для обеспечения эффективного захвата частиц возможно покрытие поверхности для сбора глицерином, силиконовым маслом или другой нелетучей, относительно инертной жидкостью с высокой вязкостью. Вставляют поддон в нижний корпус. Закрывают крышку импактора с присоединённым к корпусу уплотнением, зажимом обеспечивают герметичность соединения. Присоединяют входной порт к входному отверстию импактора. Переходник должен обеспечивать плотное соединение мундштука и открытого конца входного порта. Соединяют импактор с системой регулирования потока, как указано на рис. 4 и описано в табл. 3. Включают вакуумный насос для прокачивания воздуха через каскадный импактор и устанавливают скорость потока через систему с

помощью измерителя скорости потока воздуха, присоединённого к открытому концу входного порта. Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иначе, то прибор используют при скорости потока воздуха 30 л/мин ($\pm 5\%$). Настраивают клапан регулировки скорости потока воздуха для достижения устойчивого потока воздуха через систему с требуемой скоростью с отклонением не более $\pm 5\%$. Если нет других указаний в инструкции по применению, встряхивают ингалятор в течение 5 с и высвобождают одну дозу в воздух. Включают насос, вставляют мундштук в адаптер и производят выпуск дозы в импактор. Отсоединяют ингалятор от адаптера, встряхивают и вновь производят выпуск дозы в импактор. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос. Разбирают прибор. Отсоединяют входной порт, адаптер и мундштук, промывают их растворителем, указанным в фармакопейной статье. Аккуратно извлекают улавливающие чашки, промывают их определенными порциями растворителя, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респирабельную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика для порошков для ингаляций

Собирают прибор, помещают улавливающие чашки в соответствующие гнезда поддона. Для обеспечения эффективного захвата частиц возможно покрытие поверхности для сбора глицерином, силиконовым маслом или другой нелетучей, относительно инертной жидкостью с высокой вязкостью.

Вставляют поддон в нижний корпус. Закрывают крышку импактора с присоединённым герметизирующим корпусом, зажимом обеспечивают герметичность соединения. Пресепаратор (в случае его использования) присоединяют следующим образом: вставляют среднюю часть пресепаратора в основание пресепаратора; полученный блок устанавливают во входное отверстие импактора; помещают 15 мл используемого растворителя в центральную чашку; устанавливают сверху корпус пресепаратора; закрывают два фиксатора.

Присоединяют входной порт к входному отверстию импактора или пресепаратора. Присоединяют соответствующий адаптер для мундштука к входному порту таким образом, чтобы вставленный в него мундштук ингалятора находился на горизонтальной оси входного порта. Передняя поверхность мундштука ингалятора должна плотно и герметично прилегать к передней части входного порта. Ингалятор, присоединённый к переходнику мундштука, должен находиться в том же положении, в котором его предполагается использовать в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Соединяют импактор с системой регулирования потока, как указано на рис. 4 и описано в табл. 3.

Если нет других указаний, пропускают через прибор с подсоединённым ингалятором 4 л воздуха со скоростью потока ($Q_{исх}$), использовавшейся при определении однородности дозирования.

Подсоединяют измеритель скорости потока к входному отверстию системы. Для измерения скорости исходящего потока используют либо измеритель скорости потока, откалиброванный для потока, исходящего из измерительного прибора, либо, в случае использования прибора, откалиброванного на измерение скорости входящего потока ($Q_{вх}$), рассчитывают скорость исходящего потока ($Q_{исх}$) по закону идеального газа:

$$Q_{исх} = \frac{Q_{вх} \cdot P_0}{P_0 - \Delta P}, \quad (2)$$

где P_0 – атмосферное давление, мм рт.ст;

ΔP – перепад давления в измерительном приборе, мм рт.ст.

Устанавливают регулирующий клапан таким образом, чтобы достичь постоянной скорости потока через систему, $Q_{исх} (\pm 5 \%)$. Определяют время, в течение которого 4 л воздуха проходят через ингалятор. При присоединенном ингаляторе измеряют абсолютное давление с обеих сторон регулирующего клапана (точки замера **P2** и **P3**, рис. 4). Соотношение $P3/P2$ должно составлять $\leq 0,5$, в противном случае, производят увеличение мощности насоса и повторяют измерения.

Готовят порошковый ингалятор, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации или в инструкции по медицинскому применению. При включенном насосе и закрытом двустороннем клапане вставляют мундштук ингалятора в адаптер. Высвобождают порошок в прибор, открыв клапан на необходимое время $T (\pm 5 \%)$. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более 10. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос. Разбирают прибор. Отсоединяют пресепаратор, адаптер и мундштук, промывают их растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Аккуратно извлекают улавливающие чашки, промывают их порциями растворителя, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Используя аналитический метод, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, определяют количество действующего вещества в каждом из собранных объемов растворителей. Рассчитывают респирабельную фракцию (процентное отношение содержания действующего вещества, определенного на ступенях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, к заявленному содержанию действующего вещества) по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Извлекаемый объём

ОФС.1.4.2.0002.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на жидкие лекарственные формы для приёма внутрь. Данные испытания применимы к лекарственным формам независимо от того, поставляются они в виде жидких лекарственных форм или их получают растворением твёрдых веществ в определённом объёме указанного растворителя. Испытания не проводят для лекарственных форм в однократных упаковках, если в фармакопейную статью или нормативную документацию включено испытание на однородность дозирования.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ, ОБЪЁМ УПАКОВКИ КОТОРЫХ НЕ ПРЕВЫШАЕТ 250 МЛ

Отбирают 30 упаковок и выполняют испытание, как описано ниже для конкретной лекарственной формы.

Растворы, суспензии, эмульсии и другие жидкие лекарственные формы для приема внутрь. Встряхивают содержимое каждой из 10 упаковок и проводят испытания в соответствии с методикой.

Порошки для приготовления растворов и суспензий для приема внутрь. К содержимому каждой из 10 упаковок добавляют отмеренный объём растворителя, указанный на этикетке, в соответствии с инструкцией по применению. Встряхивают содержимое каждой упаковки и проводят испытание в соответствии с методикой.

Методика. Осторожно, чтобы избежать образования воздушных пузырьков, выливают содержимое каждой упаковки в отдельные сухие мерные,

калиброванные цилиндры, вместимость которых не более чем в 2,5 раза больше измеряемого объема. Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, содержимому каждой упаковки дают стекать в течение не более 30 мин для недозированных препаратов и 5 с – для однократных. После исчезновения воздушных пузырьков измеряют объем жидкости в каждом цилиндре.

Для однократных препаратов малого объема извлекаемый объем может быть определен следующим образом:

- выливают содержимое упаковки в сухой предварительно взвешенный бюкс, давая вытекать содержимому в течение не более 5 с;
- определяют массу содержимого;
- после определения плотности рассчитывают извлекаемый объем.

Лекарственный препарат считается прошедшим испытание, если соблюдены следующие критерии.

Для недозированных препаратов. Среднее значение объема содержимого 10 упаковок должно быть не менее 100 %, и ни одна из упаковок не должна иметь объем менее 95 % от указанного на этикетке.

Если среднее значение объема содержимого 10 упаковок менее 100 % от указанного на этикетке, но ни одна из упаковок не имеет объем менее 95 % или среднее значение объема содержимого 10 упаковок составляет 100 % и объем не более чем одной упаковки менее 95 %, но не менее 90 % от указанного на этикетке, то выполняют испытание на 20 дополнительных упаковках.

Среднее значение объема содержимого 30 упаковок должно составлять не менее 100 % от объема, указанного на этикетке, и объем не более чем одной из 30 упаковок может быть менее 95 %, но не менее 90 % от указанного на этикетке.

Для однократных препаратов. Среднее значение объема содержимого 10 упаковок должно быть не менее 100 % и объем каждой из 10 упаковок должен находиться в интервале от 95 до 110 % от объема, указанного на эти-

кетке.

Если среднее значение объёма содержимого 10 упаковок менее 100 % от указанного на этикетке, но объём для всех упаковок не выходит за пределы 95-110 % или, если среднее значение объёма содержимого 10 упаковок не менее 100 % и объём не более чем одной упаковки находится вне интервала 95-110 % и не выходит за пределы 90-115 %, то испытание выполняют на 20 дополнительных упаковках.

Среднее значение объёма содержимого 10 упаковок, полученного из 30 упаковок, должно составлять не менее 100 % от объёма, указанного на этикетке, и объём не более одной из 30 упаковок может выходить за пределы 95-110 %, но должен находиться в пределах 90-115 % от объёма, указанного на этикетке.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ, ОБЪЁМ УПАКОВОК КОТОРЫХ ПРЕВЫШАЕТ 250 МЛ

Определение проводят из одной упаковки в соответствии с приведенной выше методикой. Объём жидкости, полученной из одной упаковки, должен составлять не менее 100 % от объёма, указанного на этикетке.

**Извлекаемый объём
лекарственных форм
для парентерального применения**

ОФС.1.4.2.0003.15

Взамен ст. ГФ XI, вып. 2

Лекарственные формы для парентерального применения могут быть однодозовыми (ампулы, картриджи или заполненные шприцы) или многодозовыми, содержащими несколько доз препарата. Объём лекарственной формы в упаковке должен быть достаточным, чтобы обеспечить введение номинального объёма, указанного на этикетке.

Соответствие лекарственных форм для парентерального применения требованиям по извлекаемому объёму достигается заполнением упаковок с небольшим избытком от номинального объёма (таблица).

Таблица – Объём заполнения инъекционных растворов в однодозовых упаковках

Номинальный объём, мл	Объём заполнения, мл	
	Невязкие растворы	Вязкие растворы
0,5	0,6	0,62
1,0	1,10	1,15
2,0	2,15	2,25
5,0	5,30	5,50
10,0	10,50	10,70
20,0	20,60	20,90
30,0	30,80	31,20
50,0	51,00	51,50
Более 50	На 2 % более номинального	На 3 % более номинального

Суспензии и эмульсии перед извлечением из упаковки и перед определением плотности встряхивают. Масляные и вязкие лекарственные формы при необходимости можно подогревать в соответствии с указаниями на этикетке. Их следует тщательно встряхивать перед извлечением содержимого. Перед измерением объёма содержимое охлаждают до 20-25 °С.

Однодозовые лекарственные формы

Отбирают 5 упаковок, если номинальный объём менее 10 мл, или 3 упаковки, если номинальный объём составляет 10 мл и более. Извлекают всё содержимое каждой отобранной упаковки, используя сухой шприц, вместимость которого не более чем в 3 раза превышает измеряемый объём, снабженный подходящей иглой длиной не менее 2,5 см. Из шприца и иглы удаляют пузырьки воздуха и помещают содержимое, не выдавливая содержимое из иглы, в сухой мерный цилиндр, калиброванный на заполнение. Вместимость мерного цилиндра должна быть такой, чтобы измеряемый объём занимал не менее 40 % от номинального объёма цилиндра. Альтернативно объём содержимого в миллилитрах может быть рассчитан как отношение массы содержимого в граммах к плотности.

Для упаковок с номинальным объёмом 2 мл и менее содержимое нескольких упаковок может быть объединено, чтобы получить объём, подходящий для измерения, при условии, что для каждой упаковки используется отдельный сухой шприц. Содержимое упаковок с номинальным объёмом 50 мл или более может быть определено непосредственным выливанием в мерный цилиндр или сухой предварительно взвешенный бюкс.

Объём содержимого упаковки должен быть не менее номинального, если упаковки исследуются индивидуально. Для упаковок с номинальным объёмом 2 мл и менее измеренный объём должен быть не менее суммы номинальных объёмов исследованных упаковок.

Многодозовые лекарственные формы

Для многодозовых лекарственных форм для парентерального применения в упаковках, на которых указано количество доз определенного объёма, выбирают одну упаковку и поступают, как указано для однодозовых лекарственных форм, используя то же количество отдельных шприцев, что и количество указанных доз.

Измеренный объём должен быть таким, чтобы объём, извлекаемый из каждого шприца, обеспечивал дозу не менее заявленной.

Картриджи и заполненные шприцы

Отбирают 5 упаковок. При необходимости снабжают упаковку аксессуарами, необходимыми для использования (игла, поршень, шприц) и извлекают всё содержимое каждой отобранной упаковки, не выдавливая содержимое из иглы, в сухой предварительно взвешенный бюкс, медленно и постоянно нажимая на поршень. Взвешивают бюкс и рассчитывают объём в миллилитрах как отношение массы в граммах к плотности.

Объём, полученный для каждой исследованной упаковки, должен быть не менее номинального.

Инфузионные растворы

Отбирают одну упаковку. Переносят содержимое в сухой мерный цилиндр, калиброванный на заполнение, вместимость которого должна быть такой, чтобы лекарственная форма занимала не менее 40 % от номинального объёма цилиндра. Измеряют объём.

Объём должен быть не менее номинального.

Испытание позволяет определить истираемость таблеток без оболочки при определенных условиях, т.е. повреждения таблеток под воздействием механического удара или истирания. Методики испытания, приведенные в данной статье, применимы для большинства прессованных таблеток.

Истираемость выражают потерей в массе, вычисленной в процентах от исходной массы испытуемых таблеток.

Прибор 1. Состоит из барабана со съемной крышкой, диаметром около 200 мм и глубиной около 38 мм, изготовленного из прозрачного синтетического полимера; внутренние поверхности барабана должны быть отполированы и не должны электризоваться. По внутреннему периметру стенки барабана расположены 12 лопастей (35×35 мм) под углом 20° к касательной барабана, которые при его вращении приводят в движение таблетки (рис. 1). Барабан крепится к горизонтальной оси устройства, обеспечивающего вращение барабана со скоростью 20 об/мин.

Прибор должен автоматически выключаться по истечении заданного времени испытания.

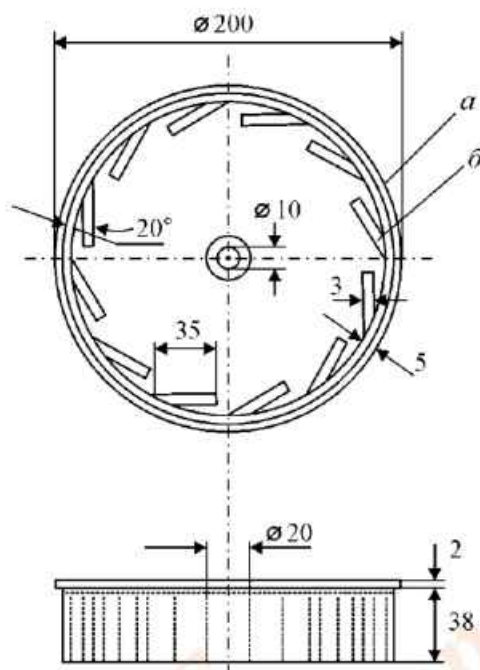


Рис. 1 – Прибор для определения истираемости таблеток

a – барабан, *б* – лопасть

Размеры указаны в миллиметрах

Методика. 10 таблеток, обеспыленных и взвешенных с точностью до 0,001 г, помещают в барабан, привинчивают крышку и включают устройство на 5 мин, что соответствует 100 оборотам барабана. По истечении установленного времени таблетки извлекают из барабана, обеспыливают и снова взвешивают с точностью до 0,001 г. Потеря в массе не должна превышать 3 %.

Прибор 2. Используют барабан (рис. 2) с внутренним диаметром $287,0 \pm 4,0$ мм и глубиной $38,0 \pm 2,0$ мм, изготовленный из прозрачного синтетического полимера; внутренние поверхности барабана должны быть отполированы и не должны электризоваться. Одна сторона барабана является съемной. При каждом обороте барабана таблетки приводятся в движение посредством изогнутой лопасти с внутренним радиусом $80,5 \pm 5,0$ мм, расположенной между центром барабана и его наружной стенкой. Барабан крепится к горизонтальной оси устройства, обеспечивающего скорость вращения барабана 25 ± 1 об/мин. Таким образом, при каждом обороте барабана таб-

летки падают, переворачиваясь или скользя, на стенку барабана или друг на друга.

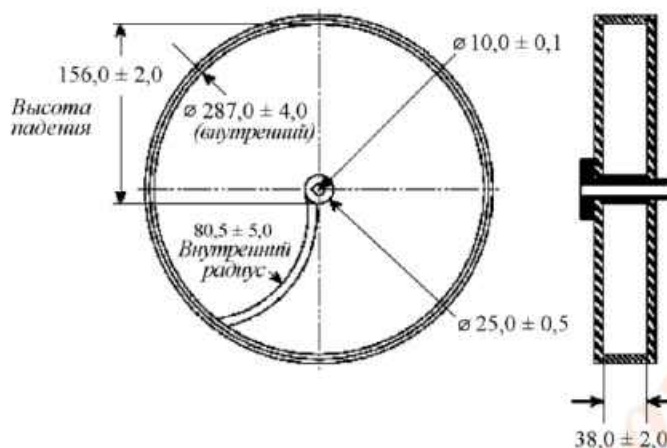


Рис. 2 – Прибор для определения истираемости таблеток
Размеры указаны в миллиметрах

Методика. При массе одной таблетки 0,65 г и менее для испытания берут количество таблеток общей массой около 6,5 г, при массе одной таблетки более 0,65 г для испытания берут 10 таблеток. Перед испытанием таблетки тщательно обеспыливают, взвешивают с точностью 0,001 г и помещают в барабан. После 100 оборотов барабана таблетки извлекают, снова обеспыливают и взвешивают с точностью 0,001 г. Потеря в массе не должна превышать 1 %.

Если после испытания обнаруживают треснутые, расколотые или разбитые таблетки, результат испытания на истираемость признают неудовлетворительным.

Если результаты испытания вызывают сомнение (имеются лишь единичные незначительные трещины или сколы, или потеря в массе незначительно превышает нормированное значение), испытание повторяют еще дважды. Потеря в массе в каждом из дополнительных испытаний или средняя потеря в массе, вычисленная по результатам 3 испытаний, не должна превышать нормированное значение.

Примечание. Если форма или размер таблеток затрудняют их перемещение внутри барабана, прибор регулируют так, чтобы лежащие рядом таблетки не упирались друг в друга и имели возможность падать свободно. Обычно достаточно установить ось барабана под углом 10° к горизонтальной поверхности.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Видимые механические включения
в лекарственных формах
для парентерального применения
и глазных лекарственных формах**

ОФС.1.4.2.0005.15

Вводится впервые

Испытание предназначено для визуальной оценки жидких и твердых парентеральных лекарственных форм, глазных лекарственных форм (капель глазных, примочек глазных, порошков для приготовления капель глазных и других) на наличие видимых механических включений.

Могут использоваться другие валидированные методы.

Испытанию подвергаются как лекарственные средства, находящиеся в процессе производства (или изготовления), так и готовый продукт.

Испытание лекарственных препаратов для парентерального применения в емкостях из непрозрачных материалов проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейных статьях.

Требования данной статьи не распространяются на суспензии и эмульсии для парентерального применения, гели для инъекций, имплантаты, лекарственные препараты с высокой вязкостью.

Механические включения – посторонние подвижные нерастворимые частицы (кроме пузырьков газа), случайно присутствующие в лекарственных препаратах для парентерального применения и глазных лекарственных формах, для которых в соответствии с требованиями ОФС «Парентеральные лекарственные формы» и «Глазные лекарственные формы» предусмотрена оценка содержания механических включений.

При проведении испытаний на механические включения учитывается объем парентеральной лекарственной формы. К препаратам «малого объема»

относятся препараты объемом 100 мл и менее, «большого объема» – более 100 мл, независимо от того, являются ли они жидкими лекарственными формами или получены из твердых лекарственных форм (порошков, лиофилизатов и др.) непосредственно перед применением.

Выборка – число емкостей, которые необходимо отобрать для испытания от каждой серии анализируемой продукции.

Количество отбираемых образцов от каждой серии парентерального препарата зависит от его агрегатного состояния (жидкое или твердое), объема (малый или большой), объема серии, а также от метода испытаний (разрушающий или неразрушающий).

Для проведения испытания препаратов, не требующих вскрытия и растворения (неразрушающее испытание), а также твердых лекарственных форм для парентерального применения, требующих вскрытия и растворения (разрушающее испытание), производят отбор выборок продукции и оценку результатов в два этапа.

На производстве от каждой серии произвольно отбирают выборку (1 и 2 ступень испытаний) для растворов малого объема в соответствии с табл. 2, для растворов большого объема – в соответствии с табл. 3, для твердых парентеральных препаратов – в соответствии с табл. 4.

В других случаях поступают, как указано в п.1. «Испытание парентеральных лекарственных форм» (см. ниже).

Оборудование

Устройство для просмотра:

- состоит из находящихся рядом в вертикальном положении черного и белого матовых экранов подходящего размера;

- оборудовано регулируемым плафоном, снабженным подходящим затемненным источником дневного света с соответствующим отражателем (осветитель может состоять из 2 флуоресцентных ламп по 13 Вт каждая, длиной 525 мм). Интенсивность освещения в точке контроля должна быть от 2000 до 3750 люкс (для цветных стеклянных и прозрачных пластмассовых

емкостей предпочтительно использовать более высокие мощности света). Допускается использование регулируемого плафона, снабженного подходящим затемненным источником дневного света или электрической лампочкой накаливания с соответствующим отражателем.

Условия проведения испытания

Помещение для проведения испытаний на механические включения защищают от прямого попадания солнечного света.

Зона испытания при просмотре должна быть освещена электрической лампой накаливания или лампой дневного света соответствующей мощности, указанной в табл. 1.

При проведении испытания жидких парентеральных и глазных лекарственных форм допускается механизированная подача емкостей в зону контроля с последующей их транспортировкой на дальнейшие стадии контроля, а также использование различных типов специальных установок для просмотра, обеспечивающих качество испытаний согласно данной ОФС.

При проведении испытания поверхность емкостей должна быть чистой и сухой.

Таблица 1 – Мощность источника света

Группа	Окраска, консистенция лекарственных препаратов	Электрическая лампа накаливания ² , Вт	Лампа дневного света, Вт
1.1	Бесцветные	60	20
1.2 ¹	Окрашенные (или опалесцирующие, вязкие)	100	30

Примечания:

1. Группа 1.2 включает бесцветные растворы в емкостях из светозащитного стекла или окрашенные растворы в емкостях из бесцветного стекла, а также опалесцирующие или вязкие жидкие лекарственные формы в емкостях из прозрачных полимерных материалов.

2. При просмотре на установках типа KVLC-10 допускается использование электрической лампы накаливания мощностью 40 Вт.

Методика

Испытание лекарственных препаратов на механические включения проводят путем их просмотра невооруженным глазом на черном и белом фоне.

Плавно вращают или переворачивают емкость, избегая образования воздушных пузырьков, и просматривают в течение примерно 5 с на черном и белом фоне. Отмечают наличие любых частиц.

1. Испытание парентеральных лекарственных форм

1.1. Испытание жидких парентеральных лекарственных форм

При получении жидких парентеральных лекарственных форм осуществляется трехкратный контроль чистоты препаратов:

- первичный – сплошной контроль;
- вторичный – выборочный контроль;
- заключительный – выборочный контроль, осуществляется перед маркировкой и упаковкой.

Первичному контролю подлежат все ампулы, флаконы, бутылки, картриджи, шприцы, шприц-тюбики, полимерные емкости и другие виды упаковок с парентеральными препаратами, прошедшими стадию стерилизации или полученными только в асептических условиях, перед их маркировкой и упаковкой.

Для проведения вторичного контроля от каждой партии, прошедшей первичный контроль, отбирают среднюю пробу – 5% от партии до 2000 единиц указанных емкостей и 250 единиц от всех других партий. При обнаружении более 2% анализируемых емкостей с механическими включениями всю партию, от которой отобрана средняя проба, возвращают для повторного первичного контроля.

Для проведения заключительного выборочного контроля отбирают среднюю пробу от каждой серии (или партии) полученной продукции перед ее маркировкой и упаковкой. При промышленном производстве нормативы объемов выборок для проведения испытаний на механические включения и

критерии их оценки приведены в табл. 1 и 2 для препаратов малых и больших объемов соответственно.

В других случаях минимальное количество емкостей для препаратов «малого объема» – не менее 80 шт. (должны соответствовать требованию: не более двух емкостей, имеющих механические включения), «большого объема» – не менее 20 шт. (должны соответствовать требованию: отсутствие емкостей с механическими включениями).

Количество емкостей, поступающих на испытания, может быть меньше и определяется правилами отбора проб в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб».

Проведение испытания и оценка результатов

Для просмотра ампулы берут за капилляры, флаконы и бутылки – за горловины, шприц-тюбики – за колпачки, вносят их в зону контроля в положении «вверх доньшками» и просматривают на черном и белом фонах. Затем плавным движением, без встряхивания, переводят их в положение «вниз доньшками» и вторично просматривают на черном и белом фонах.

Если на первой ступени контроля количество емкостей с парентеральными препаратами, содержащими механические включения (табл. 2 и 3), равно или превышает указанное в графе 5, то всю серию бракуют; если количество таких емкостей меньше указанного числа в графе 5, но больше, чем в графе 4, то проводят вторую ступень контроля на таком же количестве емкостей анализируемой продукции (графа 3).

Таблица 2 – Нормативы объемов выборок для препаратов малого объема и критерии оценки

Объем серии, шт.	Ступень визуального контроля	Объем выборки для визуального контроля, шт.	Количество емкостей с растворами малого объема, имеющими включения, шт.	
			Соответствует требованиям	Не соответствует требованиям
1	2	3	4	5
1200 3200	Первая Суммарно (по 2 ступеням)	80 160	2 6	5 и более 7 и более

Объем серии, шт.	Степень визуального контроля	Объем выборки для визуального контроля, шт.	Количество емкостей с растворами малого объема, имеющими включения, шт.	
			Соответствует требованиям	Не соответствует требованиям
3201 10000	Первая	200	6	10 и более
	Суммарно (по 2 ступеням)	400	15	16 и более
Свыше 10000	Первая	315	9	14 и более
	Суммарно (по 2 ступеням)	630	23	24 и более

Таблица 3 – Нормативы объемов выборок для препаратов большого объема и критерии оценки

Объем серии, шт.	Степень визуального контроля	Объем выборки для визуального контроля, шт	Количество емкостей с растворами большого объема, имеющими включения, шт	
			Соответствует требованиям	Не соответствует требованиям
1	2	3	4	5
151 – 280	Первая	20	0	2
	Суммарно (по 2 ступеням)	40	1	2
281 – 500	Первая	32	0	2
	Суммарно (по 2 ступеням)	64	1	2
501 – 1200	Первая	50	0	2
	Суммарно (по 2 ступеням)	100	2	3
1201 – 3200	Первая	80	0	3
	Суммарно (по 2 ступеням)	160	3	4
свыше 3200	Первая	125	1	4
	Суммарно (по 2 ступеням)	250	5	6

Заключение о качестве анализируемой серии парентерального препарата после второй ступени контроля делают на основании количества единиц продукции, имеющих механические включения в суммарном (общем) объеме первой и второй выборок в соответствии с графами 4 и 5 табл. 1 и 2.

Всю серию бракуют, если количество единиц продукции, имеющих механические включения, превышает или равно числу, указанному в графе 5 табл. 1 и 2 для суммарного объема первой и второй выборок.

Условия проведения испытания:

- Таблица 4 – Нормативы объемов выборок для твердых лекарственных форм парентерального применения и критерии оценки

Группа препаратов ^{1,2}	Количество емкостей в серии					
	до 35000 включительно		до 70000 включительно		до 105000* включительно	
	Число выборок	Кол-во образцов	Число выборок	Кол-во образцов	Число выборок	Кол-во образцов
1. Препараты, предназначенные для внутривенного введения, а также с указанием на этикетке «для инъекций»:						
- 1 г включительно	1	8	2	16	3	24
- более 1 г (до 5 г включительно)	1	5	2	10	3	15
2. Препараты, предназначенные для внутримышечного введения:						
- 1 г включительно	1	5	2	10	3	15
- более 1 г (до 5 г включительно)	1	3	2	6	3	9

* От каждых последующих 35000 флаконов (ампул) отбирается одна выборка

Примечания:

1. Для препаратов с дозировкой более 5 г число выборок, количество образцов в выборке и норма содержания механических включений должны быть указаны в фармакопейных статьях.

2. Для проведения испытания в контролирующих органах отбирают удвоенное количество образцов одной выборки вне зависимости от группы, к которой отнесен препарат. При необходимости контролирующие органы могут запросить дополнительное количество образцов, превышающее вышеуказанное удвоенное количество.

Подготовка образцов

Емкости, отобранные для просмотра, освобождают от этикеток и алюминиевых колпачков; 3 раза промывают водой, не содержащей механических включений, и подсушивают в ламинарном потоке стерильного воздуха.

Вскрытие ампул производят следующим образом: на поверхность капилляра с помощью победитового ножа наносят насечку, затем к краю насечки прикасаются раскаленной докрасна молибденовой или вольфрамовой проволокой. После охлаждения капилляр осторожно снимают. Возможен любой другой способ вскрытия, исключая попадание стекла в содержимое ампул.

Для растворения используют воду или другой растворитель, указанный в фармакопейной статье или в инструкции по применению препарата, предварительно профильтрованный через мембрану с диаметром пор не более 1,2 мкм.

Предварительно проводят визуальный контроль растворителя. Берут 10 тщательно отмытых флаконов вместимостью 10 мл и с помощью промытого медицинского шприца или фильтрующего приспособления типа «Пистолет» в каждый флакон вливают около 5 мл соответствующего растворителя. Затем флаконы закрывают резиновыми пробками, свободными от механических включений, и просматривают как указано выше.

Растворитель пригоден для испытания, если в 9 флаконах из 10 не обнаружено механических включений, видимых невооруженным глазом.

Введение растворителя в емкости (флаконы, ампулы и др.) проводят через горловину с помощью фильтрующего приспособления типа «Пистолет» и других или с помощью предварительно промытого шприца: допускается введение растворителя через пробку с помощью шприца с иглой № 08×40 (внешний диаметр иглы 0,8 мм, длина 40 мм), предварительно промытой внутри и снаружи водой, не содержащей механических включений.

Растворитель вводят в количестве, достаточном для полного растворения препарата (около половины объема емкости), или в объеме, указанном в фармакопейной статье или в инструкции по применению. Затем емкости вновь закрывают пробками. Препарат должен быть полностью растворен при встряхивании.

Примечания

1. Легко гидролизующиеся препараты растворяют непосредственно перед контролем.

2. Для высокомолекулярных соединений (белки, полисахариды, гликопротеиды и др.) в нормативной документации на препарат или в инструкции по применению указывают растворители, pH, время и условия растворения, а также другие факторы, влияющие на процесс растворения.

Проведение испытания и оценка результатов

Для просмотра ампулы берут за капилляры, флаконы и бутылки – за горловины, вносят их в зону контроля в положении «вниз доньшками», плавно вращают, избегая образования воздушных пузырьков, и просматривают на черном и белом фонах. Затем флаконы и бутылки плавным движением, без встряхивания, переводят в положение «вверх доньшками» и вторично просматривают на черном и белом фонах. Отмечают наличие любых частиц.

Первоначально просматривают образцы суммарной выборки в зависимости от числа упаковок в серии (табл. 4) и подсчитывают в каждом образце число механических включений. При обнаружении в одной емкости свыше 5 механических включений дальнейший подсчет не производят. За результат просмотра в этом случае принимают цифру 7. Суммируют число

механических включений, обнаруженных во всех образцах первой полной выборки, и делят на число выборок.

При обнаружении в препаратах первой выборки, предназначенных для *внутривенного введения*, с указанием на этикетке «для инъекций»:

- 15 механических включений и менее – серия соответствует требованиям;
- 20 механических включений и более – серию бракуют;
- от 16 до 19 механических включений – отбирают вторую выборку в том же количестве (табл. 3) и просматривают по той же методике.

При обнаружении в препаратах первой выборки, предназначенных для *внутримышечного введения*:

- 23 механических включения и менее – серия соответствует требованиям;
- 29 механических включений и более – серию бракуют;
- от 24 до 28 механических включений – отбирают вторую выборку в том же количестве (табл. 3) и просматривают по той же методике.

В случае контроля удвоенной выборки результаты первой и второй выборок суммируют.

При обнаружении в препаратах, предназначенных для *внутривенного введения*, с указанием на этикетке «для инъекций»:

- 34 механических включения и менее – серия соответствует требованиям;
- 35 механических включений и более – серию бракуют.

При обнаружении в препаратах, предназначенных для *внутримышечного введения*:

- 52 механических включения и менее – серия соответствует требованиям;
- 53 механических включений и более – серию бракуют.

При обнаружении в выборке хотя бы одной частицы стекла отбирают дополнительную выборку в том же количестве.

Серию считают годной, если ни в одной из емкостей дополнительной выборки не обнаружено ни одной частицы стекла.

2. Испытание глазных лекарственных форм

Испытание предназначено для визуальной оценки на наличие видимых механических включений глазных лекарственных форм в виде капель глазных, примочек глазных, инъекционных глазных лекарственных форм, твердых глазных лекарственных форм для приготовления капель глазных, пленок глазных.

При получении указанных глазных лекарственных форм осуществляют двукратный контроль на механические включения:

- первичный;
- вторичный – выборочный контроль для готовой продукции.

Первичному контролю подлежат все препараты, прошедшие стадию стерилизации или полученные только в асептических условиях, перед их маркировкой и упаковкой.

Вторичный выборочный контроль осуществляется для готовой продукции. Для этого из серии отбирают 1% единиц продукции, но не менее 50 емкостей с растворами глазных лекарственных форм.

В случае упаковки жидких глазных лекарственных форм в емкости из непрозрачных материалов, твердых глазных лекарственных форм в емкости из стекла или прозрачных полимерных материалов, а также твердых глазных лекарственных форм в емкости из непрозрачных материалов количество емкостей, подлежащих испытанию, регламентируется предприятием-изготовителем.

Емкости с жидкими глазными лекарственными формами, в которых обнаружены видимые механические включения, считаются забракованными.

Проведение испытания и оценка результатов

Жидкие глазные лекарственные формы

Испытание проводят в помещениях класса Д.

Для просмотра берут не более 5 емкостей из стекла за горловину и не более 7-8 емкостей из прозрачных полимерных материалов за колпачки, вносят в зону контроля «вверх доньшками» и просматривают на черном и белом фонах. Затем плавным движением, без встряхивания, переводят емкости в положение «вниз доньшками» и вторично просматривают на черном и белом фонах.

Время просмотра одной емкости из стекла – 3-5 с, группы емкостей – 8-10 с, а группы емкостей из прозрачных полимерных материалов – не менее 15 с.

В случае использования упаковки из непрозрачных материалов определение проводят методом разрушающего контроля, осуществляя подготовку образцов в помещениях класса чистоты В.

От каждой серии препарата отбирают среднюю пробу в количестве 10 емкостей. Отобранные образцы перед вскрытием 3 раза промывают водой, не содержащей механических включений. Промытые образцы высушивают в ламинарном потоке воздуха. Вскрывают емкости в помещениях класса чистоты А, переносят содержимое каждой емкости в отдельный стеклянный флакон, не содержащий механических включений, и закрывают резиновой пробкой, свободной от механических включений. Далее контроль на механические включения проводят невооруженным глазом на черном и белом фонах.

Твердые глазные лекарственные формы для приготовления капель глазных в емкостях из стекла или прозрачных полимерных материалов – испытание проводят в соответствии с требованиями, описанными в разделе 1.2; отбирая среднюю пробу в количестве 10 емкостей.

Твердые глазные лекарственные формы для приготовления капель глазных в емкостях из непрозрачных материалов – испытание проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейных статьях.

Пленки глазные – испытание проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейных статьях.

При просмотре фиксируют количество ворсинок в каждой единице испытуемой продукции.

В случае обнаружения в единице продукции хотя бы одной твердой частицы или более 5 ворсинок проводят повторный контроль на удвоенном количестве емкостей. В случае обнаружения хотя бы в одной единице продукции частичек стекла – серия бракуется.

При обнаружении в удвоенном количестве емкостей в единице продукции хотя бы одной твердой частицы или более 5 ворсинок серия полностью бракуется.

Качество продукции определяется по коэффициенту дефектности, который рассчитывается как среднеарифметическое число ворсинок из взятых на вторичный просмотр единиц продукции.

Серия считается годной для препаратов:

- во флаконах, если коэффициент дефектности не превышает 1,5;
- в тубик-капельницах, если во взятом на просмотр количестве тубик-капельниц не более 4% единиц продукции, содержащих механические включения (при этом в каждом тубике-капельнице не должно быть более 5 ворсинок).

Глазные лекарственные формы с опалесценцией не бракуются в случае, если опалесценция допускается фармакопейной статьей или действующей нормативной документацией.

Испытания лекарственных форм для парентерального введения и капель глазных при изготовлении в аптеке

В аптеке осуществляют первичный контроль на механические включения всех изготовленных емкостей с растворами парентерального введения и каплями глазными в соответствии с методиками, приведенными ранее. Лекарственные средства подвергаются контролю дважды: до стерилизации (после приготовления и укупорки) и после стерилизации – до маркировки. При этом в каждой емкости механические включения должны отсутствовать.

**Невидимые механические
включения в лекарственных
формах для парентерального
применения**

ОФС.1.4.2.0006.15

Вводится впервые

Испытание на наличие невидимых механических включений предназначено для твердых и жидких лекарственных форм для парентерального применения.

Механические включения в лекарственных формах для парентерального применения – это посторонние подвижные нерастворимые частицы, за исключением пузырьков газа, случайно присутствующие в растворах препаратов.

Для определения частиц, невидимых невооруженным глазом (размером менее 100 мкм), используют три метода.

Метод 1 – счетно-фотометрический метод.

Метод 2 – метод электрочувствительных зон (метод Култера).

Метод 3 – метод микроскопии.

При испытании лекарственных форм для парентерального применения на присутствие частиц, которые не видны невооруженным глазом, предпочтительнее применять методы 1 или 2. Однако в некоторых случаях для получения обоснованного заключения необходимо использовать и метод 3.

Метод 1 не пригоден для исследования мутных лекарственных форм (например, эмульсий, коллоидных и липосомальных препаратов) или лекарственных форм, образующих воздушные или газовые пузыри при прохождении через измерительную ячейку. В таком случае испытание проводят по методу 3. При исследовании мутных лекарственных форм (например, эмульсий)

возможно применение метода 2 после проведения количественного разбавления препарата соответствующим растворителем, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Если вязкость испытуемого препарата достаточно высока, это служит препятствием для его испытания любым из методов. Для понижения вязкости проводят количественное разбавление соответствующим растворителем, свободным от механических частиц, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Результат, полученный для отдельной единицы или группы единиц препарата, не может быть достоверно экстраполирован на другие единицы, которые не прошли испытания. Поэтому для получения правильных выводов об уровне загрязнения механическими включениями большой партии препарата необходимо соблюдать правила отбора проб в соответствии с ОФС «Отбор проб».

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ

Испытание следует проводить в условиях, ограничивающих загрязнение механическими включениями, – предпочтительно в шкафу с ламинарным потоком. Стеклопосуду и оборудование для фильтрации, за исключением мембранных фильтров, осторожно промывают теплым раствором deterгента и ополаскивают большим объемом воды для удаления следов поверхностно-активного вещества. Непосредственно перед использованием повторяют промывание снаружи и внутри водой, свободной от частиц.

Следует избегать попадания воздушных пузырей в исследуемый препарат, особенно в тех случаях, когда пробы препарата отбирают в емкость, в которой проводится испытание.

Испытание растворов для парентерального применения в упаковках объемом 25 мл и более проводят на единичных упаковках. Для упаковок, содержащих менее 25 мл, содержимое 10 или большего числа упаковок объединяют в чистой емкости для получения объема не менее 25 мл. Испытуемый раствор может быть приготовлен также путем смешивания содержимого со-

ответствующего числа упаковок с последующим разбавлением до 25 мл водой, свободной от частиц, или свободным от частиц растворителем, если невозможно использовать воду, свободную от частиц, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Порошки для приготовления растворов для парентерального применения растворяют в воде, свободной от частиц, или в соответствующем растворителе, свободном от частиц, если невозможно использовать воду, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Число испытываемых образцов должно быть достаточным для получения статистически значимого результата. Испытания образцов объемом 25 мл и более можно проводить на серии менее 10 шт. в соответствии с правилами отбора проб согласно ОФС «Отбор проб».

1. Счетно-фотометрический метод

Прибор. Испытание проводят на приборах, основанных на принципе светоблокировки и позволяющих определять размер частиц и число частиц соответствующего размера. Прибор калибруют с помощью дисперсии сферических частиц (стандартный образец), имеющих известный размер от 10 до 25 мкм. Стандартный образец диспергируют в воде, свободной от частиц. Следует соблюдать осторожность, чтобы избежать агрегации частиц в процессе диспергирования.

Проверка пригодности условий проведения испытания. Предварительно проводят проверку пригодности условий (окружающей среды, подготовленной стеклянной посуды и используемой воды) для проведения испытания. Для этого определяют наличие механических включений в 5 пробах воды, свободной от частиц, по 5 мл каждая, по описанной ниже методике. Если в 25 мл для объединенных 5 проб число частиц размером 10 мкм и более превысит 25, то условия не пригодны для проведения испытания.

Подготовительные этапы проведения испытания необходимо повторять, пока окружающая среда, стеклянная посуда и вода не станут пригод-

ными для проведения испытания.

Методика. Перемешивают содержимое образца, медленно переворачивая его 20 раз. При необходимости осторожно удаляют этикетки и элементы укупорки. Очищают наружные поверхности вскрываемой упаковки струей воды, свободной от частиц, и удаляют пробку, избегая какого-либо загрязнения содержимого. Готовят испытуемый раствор в соответствии с указаниями, приведенными выше, в зависимости от объема содержимого контейнера. Для удаления пузырьков воздуха приготовленный раствор оставляют стоять в течение 2 мин или обрабатывают ультразвуком.

В объединенной пробе объемом не менее 25 мл определяют число частиц размером, равным или превышающим 10 и 25 мкм. Проводят 4 измерения. При этом не принимают в расчет результаты определения для первой пробы и рассчитывают среднее число частиц в испытуемом образце.

Оценка результатов. Препараты с номинальным объемом 100 мл и менее отвечают требованиям, если в одной упаковке среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 6000, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 600.

Препараты с номинальным объемом более 100 мл отвечают требованиям, если в 1 мл среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 25, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 3.

Если среднее число частиц превышает указанные значения, то проводят испытание препарата методом микроскопии.

2. Метод электрочувствительных зон (метод Култера)

Прибор. Определение проводят с использованием счетчика Култера, в котором трубка с апертурой (калиброванным отверстием диаметром 100 мкм) в стенке и двумя электродами погружена в стакан, содержащий частицы, взвешенные в электролите низкой концентрации. Метод основан на регистрации электрических импульсов, возникающих при прохождении частицы через апертуру. Величина импульса пропорциональна размеру частицы.

На результаты, полученные на приборе, не влияют цвет частиц, показатель преломления частицы или жидкости, а также форма частиц.

Прибор калибруют с помощью дисперсии латексных частиц (стандартный образец), имеющих известный размер от 10 до 25 мкм. Стандартный образец диспергируют в растворе натрия хлорида 0,9 %, свободном от частиц.

Проверка пригодности условий проведения испытания. Предварительно проводят проверку пригодности условий (окружающей среды, подготовленной стеклянной посуды и используемого раствора натрия хлорида 0,9 %) для проведения испытания. Для этого определяют наличие механических включений в 3 пробах раствора натрия хлорида 0,9 % по 20 мл каждая. Если в 60 мл для объединенных 3 проб число частиц размером 10 мкм превысит 60, то условия не пригодны для проведения испытания.

Подготовительные этапы проведения испытания необходимо повторять, пока окружающая среда, стеклянная посуда и раствор натрия хлорида 0,9 % не станут пригодны для проведения испытания.

Методика. Перемешивают содержимое образца, медленно переворачивая его не менее 20 раз. Очищают наружные поверхности вскрываемой упаковки струей воды, свободной от частиц, вскрывают его, избегая какого-либо загрязнения содержимого. Готовят испытуемый раствор в соответствии с указаниями, приведенными в разделе «Условия проведения испытания».

В качестве свободного от частиц растворителя, как правило, используют коммерческий или приготовленный в лаборатории раствор натрия хлорида 0,9%.

Для удаления пузырьков воздуха приготовленный раствор оставляют стоять в течение 2 мин или обрабатывают ультразвуком.

В объединенной пробе объемом не менее 20 мл определяют число частиц размером, равным или превышающим 10 и 25 мкм.

Принимают в расчет результаты 3 измерений и рассчитывают среднее число частиц в испытуемом образце.

Оценка результатов. Препараты с номинальным объемом 100 мл и

менее отвечают требованиям, если в одной упаковке среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 6000, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 600.

Препараты с номинальным объемом более 100 мл отвечают требованиям, если в 1 мл среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 25, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 3.

Если среднее число частиц превышает указанные значения, то проводят испытание препарата методом микроскопии.

3. Метод микроскопии

Оборудование: бинокулярный микроскоп и фильтровальная установка.

Микроскоп оборудован окуляр-микрометром и двумя осветителями. Микроскоп настроен на 100-кратное увеличение.

Поле зрения окуляр-микрометра представляет собой окружность, разделенную по диаметру, и состоит из большого круга, разделенного перекрестиями на квадранты, прозрачные и черные стандартные окружности диаметром 10 и 25 мкм при стократном увеличении, и линейной шкалы с ценой деления 10 мкм. Шкала калибруется по аттестованному объект-микрометру. Относительная ошибка линейной шкалы допускается в пределах $\pm 2\%$.

Один из осветителей – яркий эпископический осветитель, встроенный в микроскоп, другой – внешний, фокусируемый осветитель, позволяющий обеспечить отраженное боковое освещение под углом 10-20°.

Фильтровальная установка предназначена для удерживания механических включений и состоит из держателя фильтра, изготовленного из стекла или другого подходящего материала, источника вакуума и мембранного фильтра с размером пор 1,0 мкм или менее.

Проверка пригодности условий проведения испытания. Предварительно проводят проверку пригодности условий (окружающей среды, подготовленной стеклянной посуды, фильтровального оборудования и используемой воды) для проведения испытания. Для этого определяют наличие меха-

нических включений в 50 мл воды, свободной от частиц, по описанной ниже методике. Если в 50 мл воды число частиц размером 10 мкм и более превышает 20 или число частиц размером 25 мкм и более превышает 5, то условия не пригодны для проведения испытания.

Подготовительные этапы проведения испытания необходимо повторять, пока окружающая среда, стеклянная посуда, фильтровальное оборудование и вода не станут пригодными для проведения испытания.

Методика. Перемешивают содержимое образца, медленно переворачивая его 20 раз. При необходимости осторожно удаляют этикетки и элементы укупорки. Очищают наружные поверхности вскрываемого контейнера струей воды, свободной от частиц, и удаляют пробку, избегая какого-либо загрязнения содержимого. Готовят испытуемый раствор в соответствии с указаниями, приведенными выше, в зависимости от объема содержимого контейнера.

Внутреннюю сторону держателя фильтра с укрепленным мембранным фильтром смачивают несколькими миллилитрами воды, свободной от частиц. Переносят в воронку для фильтрования весь объем раствора или объем одного контейнера и подключают вакуум. При необходимости раствор прибавляют порциями до тех пор, пока не будет отфильтрован весь объем. После последнего прибавления раствора промывают внутренние стенки держателя фильтра водой, свободной от частиц. Вакуум оставляют включенным до тех пор, пока поверхность фильтра не освободится от жидкости. Помещают фильтр на предметное стекло в чашку Петри и сушат на воздухе со слегка приоткрытой крышкой. По окончании сушки предметное стекло с фильтром помещают на столик микроскопа и просматривают всю поверхность фильтра в отраженном свете. Определяют число частиц размером 10 мкм и более, и число частиц размером 25 мкм и более. Допускается просмотр части фильтра с последующей экстраполяцией полученного результата на всю площадь фильтра. Рассчитывают среднее число частиц в испытуемом препарате.

При подсчете частиц микроскопическим методом не следует опреде-

лять размеры или число аморфных или других образований неопределенной морфологии типа пятен или пленок. В этом случае следует использовать метод 1 или 2.

Оценка результатов. Препараты с номинальным объемом 100 мл и менее отвечают требованиям, если в одной упаковке среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 3000, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 300.

Препараты с номинальным объемом более 100 мл отвечают требованиям, если в 1 мл среднее число частиц размером 10 мкм и более не превышает 12, а среднее число частиц размером 25 мкм и более не превышает 2.

Метод микроскопии является арбитражным.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Масса (объем) содержимого
упаковки**

ОФС.1.4.2.0007.15

Вводится впервые

Данное испытание относится к недозированным лекарственным формам: мазям, жидким лекарственным формам для наружного и местного применения, порошкам, аэрозолям, спреям и другим лекарственным формам, находящимся в упаковке с массой (объемом) содержимого не более 250 г (250 мл), за исключением жидких лекарственных форм для приема внутрь и лекарственных форм для парентерального применения.

Методика для лекарственных форм, кроме аэрозолей и спреев

Для упаковок, маркированных по массе. Отбирают 10 заполненных упаковок и удаляют этикетки. Тщательно промывают и высушивают внешнюю поверхность каждой упаковки и взвешивают упаковки по отдельности. Количественно удаляют содержимое из каждой упаковки и промывают все части упаковки растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Высушивают и снова взвешивают каждую упаковку вместе с соответствующими деталями. По разности масс вычисляют массу содержимого упаковки.

Для упаковок, маркированных по объему. Выливают содержимое каждой из 10 упаковок в 10 сухих мерных калиброванных цилиндров, давая полностью стечь жидкости. Определяют объем содержимого каждой упаковки.

Среднее значение массы (объема) содержимого 10 упаковок не должно быть менее указанного на этикетке, масса (объем) содержимого каждой отдельной упаковки должна быть не менее 90 % от указанной на этикетке для

содержимого 60 г или 60 мл и менее, или не менее 95 % от указанной на этикетке для содержимого более 60 г или 60 мл.

Если это требование не выполняется для 2 и более упаковок, то испытание считается не пройденным. Если это требование не выполняется для одной упаковки, то определяют массу (объем) содержимого 20 дополнительных упаковок.

Среднее значение массы (объема) содержимого 30 упаковок должно быть не менее указанного на этикетке, и масса (объем) содержимого не более чем одной из 30 упаковок может быть менее 90 % (но не менее 85 %) от указанного на этикетке для содержимого 60 г или 60 мл и менее, или менее 95 % (но не менее 90%) от указанного на этикетке для содержимого более 60 г или 60 мл.

Методика для аэрозолей и спреев. Отбирают 10 заполненных упаковок и удаляют этикетки. Тщательно промывают и высушивают внешнюю поверхность каждой упаковки и взвешивают упаковки по отдельности. Удаляют содержимое из каждой упаковки, используя безопасную технологию (например, охлаждают для снижения внутреннего давления, удаляют клапан и выливают). Остатки содержимого удаляют и ополаскивают элементы упаковки растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Резервуар, клапан и другие детали нагревают при 100 °C в течение 5 мин. Охлаждают и снова взвешивают каждую упаковку со всеми деталями. По разности масс определяют массу содержимого упаковки. Требование выполняется, если масса содержимого каждой из 10 упаковок не менее, указанной на этикетке.

Однородность дозирования**ОФС.1.4.2.0008.15**
Вводится впервые

Целью испытания на однородность дозирования является контроль равномерности распределения действующего вещества по отдельно взятым единицам дозированной лекарственной формы (таблеткам, капсулам, суппозиториям и др.). Результаты этого испытания позволяют количественно оценить показатели, характеризующие разброс в содержании действующего вещества по отдельно взятым единицам испытуемого дозированного препарата.

Испытание на однородность дозирования применимо к дозированным лекарственным формам, содержащим как одно, так и несколько действующих веществ.

Данному испытанию обычно не подвергают поливитаминные лекарственные препараты; лекарственные препараты, содержащие микроэлементы; содержащие активные компоненты растительного или животного происхождения и другие препараты при наличии соответствующего обоснования, а также суспензии, эмульсии, гели, предназначенные для наружного применения.

Испытание на однородность дозирования может быть выполнено двумя способами:

- количественным определением содержания действующего вещества по отдельности в каждой отобранной для испытания единице препарата (способ 1);
- точным определением массы нетто каждой отобранной для испытания единицы препарата (способ 2).

Способ 1 применим для любых дозированных лекарственных форм

Способ 2, при отсутствии специальных обоснований, применим для оценки однородности дозирования действующего вещества при его содержании в препарате ≥ 25 мг и массовой доле ≥ 25 %. Условиями, определяющими возможность применения способа 2, являются также равномерное распределение действующего вещества по массе испытуемого препарата и предусмотренное в фармакопейной статье использование навесок усредненной пробы при количественном определении действующего вещества.

Случаи возможного применения способов 1 и 2 по отношению к различным лекарственным формам приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Применимость способов 1 и 2 для оценки однородности дозирования

Лекарственная форма		Доза и массовая доля действующего вещества	
		≥ 25 мг и ≥ 25 %	< 25 мг или < 25 %
		Способ	
Таблетки	без оболочки	2	1
	покрытые пленочной оболочкой	2	1
	покрытые оболочкой методом дражирования или прессования	1	
Капсулы	твердые	2	1
	мягкие, содержащие суспензию, гель или эмульсию	1	
	мягкие, содержащие раствор	2	
Гранулы в однократной упаковке		1	
Порошки в однократной упаковке	однокомпонентные без вспомогательных веществ	2	
	содержащие два и более действующих веществ и/или вспомогательные вещества	1	

Лекарственная форма		Доза и массовая доля действующего вещества	
		≥25 мг и ≥25 %	<25 мг или <25 %
		Способ	
Лиофилизированные препараты в однократной упаковке		2	
Суспензии, эмульсии, гели в однократной упаковке, предназначенные для парентерального применения и приема внутрь		1	
Суппозитории		1	
Трансдермальные пластыри		1	
Примечания			
Способ 1 – прямое определение содержания действующего вещества.			
Способ 2 – расчетное определение содержания действующего вещества по массе единиц дозированного препарата.			

Наряду со способом 2 в фармакопейную статью может быть включена в качестве альтернативной методика проведения испытания по способу 1, результат которой следует считать окончательным.

Определение однородности дозирования

От испытываемой серии препарата отбирают случайным образом пробу в количестве 30 единиц, из них в произвольном порядке отбирают 10 единиц для проведения первого этапа испытания. В каждой из отобранных единиц определяют содержание действующего вещества по способу 1 или 2. Оставшиеся 20 единиц лекарственной формы сохраняют для проведения второго этапа испытания.

В каждой из 10 отобранных единиц испытываемого препарата ($n = 10$) определяют содержание действующего вещества по методике, приведенной в соответствующем разделе фармакопейной статьи. Каждый из полученных результатов выражают в процентах (x_i) от номинального содержания дейст-

вующего вещества в одной дозе (i – номер единицы препарата по порядку проведения анализа).

Для каждой из 10 отобранных единиц испытуемого препарата ($n = 10$) определяют массу (w_i) непосредственно или по разности масс заполненной и полностью опорожненной упаковки (массу нетто) с точностью взвешивания $\pm 0,0002$ г. В фармакопейной статье предусматривают меры, обеспечивающие полноту удаления препарата из опорожненных упаковок, но не приводящие к изменению их масс.

С использованием полученных результатов в каждой из 10 единиц препарата вычисляют содержание действующего вещества в процентах (x_i) от номинального значения:

$$x_i = w_i \times \frac{A}{\bar{W}},$$

где: i – номер единицы препарата по порядку взвешивания;

w_i – масса нетто единицы испытуемого препарата;

$\bar{W}$ – средняя масса нетто, определенная на единицах препарата, использованных в тесте «Количественное определение»;

A – содержание действующего вещества в единице испытуемого препарата, полученное, как указано в разделе «Количественное определение», и выраженное в процентах от номинального значения.

Примечание – Величину A рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{B}{L} \times 100$$

где: B – содержание действующего вещества в единице испытуемого препарата (таблетке, капсуле, ампуле, флаконе и др.), полученное как указано в разделе «Количественное определение»;

L – номинальное содержание действующего вещества в единице испытуемого препарата.

Вычисление показателей приемлемости

Для полученной любым из описанных способов совокупности значений x_i рассчитывают величины среднего арифметического ($\bar{X}$) и стандарт-

ного отклонения (s).

Соответственно найденной величине $\bar{X}$ выбирают эталонное значение дозы (M) и рассчитывают значения первого (AV) и при необходимости второго ($|M - x_i| \max$) показателей приемлемости результатов испытания на «однородность дозирования».

Сведения, необходимые для проведения расчетов, выбора эталонного значения дозы и нормирования первого и второго показателей приемлемости, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Порядок обработки экспериментальных данных

Обозначение	Определение	Пояснения (условия)	Формула или значение
n	Число единиц препарата, участвующих в испытании (объем выборки)	Первый этап	10
		Второй этап	30
i	Номер единицы препарата по порядку анализа или взвешивания		от 1 до n
x_i	Содержание действующего вещества в единице испытуемого препарата, в %	Результаты рассчитывают в % от номинального значения содержания действующего вещества	Определяют экспериментально (по способу 1 или способу 2), как указано в фармакопейной статье
$\bar{X}$	Среднее арифметическое значений x_i , в %	Вычисляют при $n = 10$ или $n = 30$	$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$
k	Константа приемлемости для f степеней свободы ($f = n - 1$) при доверительной вероятности P, равной 95 %	При $n = 10$	2,4
		При $n = 30$	2,0
s	Стандартное отклонение	Вычисляется соответственно объему выборки при $n = 10$ или 30	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$
M	Эталонное значение дозы в % от ее номинального значения	При $98,5 \% \leq \bar{X} \leq 101,5 \%$	$\bar{X}$
		При $\bar{X} < 98,5 \%$	98,5
		При $\bar{X} > 101,5 \%$	101,5
AV	Первый	Вычисляется соот-	$ M - \bar{X} + k \times s$

Обозначение	Определение	Пояснения (условия)	Формула или значение
	показатель приемлемости, в %	ответственно значению М	
L1	Максимально допустимое значение AV, в %	Должно выполняться условие $AV \leq L1$ при $n = 10$ или 30	15,0
L2	Опорное значение второго показателя приемлемости, в %		25,0
$ M - x_i _{\max}$	Второй показатель приемлемости, в %	Для величин x_i должно выполняться условие $ M - x_i \leq 0,01 \cdot L2 \cdot M$	$0,01 \cdot L2 \cdot M$

Примечания

1. В таблице 2 указаны значения М для препаратов, в которых не предусмотрено превышение дозировки действующего вещества по отношению к номинальному значению.

2. Если предусмотрен избыток в содержании действующего вещества, то эту величину выражают в процентах (Т) от номинального значения ($T > 101,5 \%$). Допускается также, если это предусмотрено в фармакопейной статье, рассчитывать Т как процентное отношение среднего арифметического верхнего и нижнего пределов содержания действующего вещества в одной дозе препарата от номинального значения.

Величина М выбирается соответственно найденному значению $\bar{X}$:

- при $98,5 \% \leq \bar{X} \leq T$ принимают $M = \bar{X}$;
- при $\bar{X} < 98,5 \%$ принимают $M = 98,5 \%$,
- при $\bar{X} > T$ принимают $M = T$.

С использованием принятого значения М рассчитывают первый и второй показатели приемлемости, как это указано в таблице 2.

Интерпретация результатов

Если не указано иначе в частной фармакопейной статье, то результат испытания признается удовлетворительным, если при $n = 10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$.

Если это условие не выполняется, испытание продолжают на оставшихся 20 ранее отобранных единицах испытуемого препарата. Окончательный результат испытания признается удовлетворительным, если при $n = 30$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$ и все значения x_i удовлетворяют

неравенству $|M - x_i| \leq 0,01 \cdot L2 \cdot M$.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Однородность массы дозированных
лекарственных форм**

ОФС.1.4.2.0009.15

Вводится впервые

Данное испытание относится к дозированным лекарственным формам (таблеткам, капсулам, суппозиториям и др.) и однократным лекарственным формам в индивидуальных упаковках (гранулам, порошкам, лиофилизатам и др.). Испытание не применяют в случае, если проводят испытание на однородность дозирования.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, данное испытание не проводят для поливитаминных лекарственных препаратов и для лекарственных препаратов, содержащих микроэлементы.

Испытание проводят на 20 единицах дозированной лекарственной формы или содержанием 20 индивидуальных упаковок однократных лекарственных форм, отобранных случайным образом.

Методика. Определяют среднюю массу взвешиванием 20 единиц дозированной лекарственной формы или содержимого 20 индивидуальных упаковок однократных лекарственных форм: взвешивают каждую единицу в отдельности с точностью до 0,001 г, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, и рассчитывают среднюю массу.

Для капсул и твердых лекарственных форм в однократных упаковках массу содержимого определяют, как описано ниже.

Капсулы. Взвешивают невскрытую капсулу. Вскрывают капсулу и удаляют как можно полнее ее содержимое. Оболочку мягких капсул промывают растворителем, указанным в фармакопейной статье или нормативной доку-

ментации, и оставляют на воздухе до удаления запаха растворителя. Взвешивают оболочку. Массу содержимого каждой капсулы рассчитывают как разность между взвешиваниями. Повторяют определение на 19 оставшихся капсулах.

Твердые лекарственные формы (порошки, гранулы, лиофилизаты) в однократных упаковках. При необходимости удаляют бумажную этикетку с поверхности индивидуальной упаковки. Промывают и высушивают внешнюю поверхность упаковки. Вскрывают упаковку и тотчас взвешивают. Осторожным постукиванием освобождают упаковку от содержимого как можно полнее, при необходимости ополаскивают её водой, затем спиртом 96 % и сушат при температуре от 100 до 105 °С в течение 1 ч или, если материал упаковки не позволяет использовать нагревание при этой температуре, сушат при более низкой температуре до постоянной массы. Охлаждают в эксикаторе и взвешивают. По разности взвешиваний рассчитывают массу содержимого упаковки. Повторяют определение на 19 оставшихся индивидуальных упаковках.

Требование. Лекарственную форму считают выдержавшей испытание, если не более 2 индивидуальных масс отклоняются от средней массы на величину, превышающую допустимое отклонение, указанное в таблице. При этом ни одна индивидуальная масса не должна отклоняться от средней массы на величину, в 2 раза превышающую значение, указанное в таблице.

Таблица – Допустимые отклонения от средней массы дозированных лекарственных форм

Дозированная лекарственная форма	Средняя масса, мг	Допустимое отклонение, %
Таблетки без оболочки и таблетки, покрытые пленочной оболочкой	80 мг и менее	10
	Более 80 мг, но менее 250 мг	7,5
	250 мг и более	5

Дозированная лекарственная форма	Средняя масса, мг	Допустимое отклонение, %
Таблетки с оболочкой, полученной методом дражирования	Для всех случаев	15
Капсулы и гранулы без покрытия, порошки для приема внутрь и наружного применения	Менее 300 мг	10
	300 мг и более	7,5
Твердые лекарственные формы для приготовления лекарственных форм для парентерального применения	Более 40 мг	10
	40 мг и менее *	–
Суппозитории	Для всех случаев	5

* Лекарственная форма подлежит испытанию на однородность дозирования и не подлежит испытанию на однородность массы.

**Определение времени полной
деформации суппозиториев
на липофильной основе**

ОФС.1.4.2.0010.15

Взамен ст. ГФ XI, вып. 2

Испытание позволяет при заданных условиях определить время, необходимое для полной деформации суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, под действием приложенной массы.

Прибор 1 (рис. 1) состоит из плоскодонной стеклянной трубки (1) с внутренним диаметром 15,5 мм и длиной около 140 мм и стержня (2) диаметром 5,0 мм, расширяющегося книзу до диаметра 12 мм, со свободно скользящим поддерживающим устройством (3), имеющим отверстие диаметром 5,2 мм. К нижней, плоской стороне стержня крепится металлическая игла (4) диаметром 1 мм и длиной 2 мм. На верхней части стержня имеется скользящее маркировочное кольцо (5).

Стержень состоит из 2 соединенных частей: нижней, изготовленной из пластмассы, и верхней, изготовленной из пластмассы или металла с диском определенной массы. Масса всего стержня $30 \pm 0,4$ г.

Методика. Устанавливают нулевое положение маркировочного кольца, для чего вводят стержень в стеклянную трубку до достижения дна и фиксируют это положение поддерживающим устройством. При этом маркировочное кольцо передвигается на уровень верхнего края поддерживающего устройства стержня (нулевое положение).

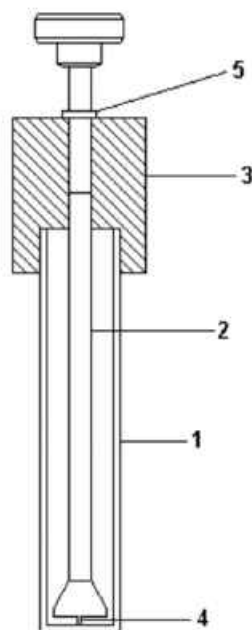


Рис. 1 – Прибор 1

1 – стеклянная трубка; 2 – стержень; 3 – поддерживающее устройство стержня; 4 – металлическая игла; 5 – маркировочное кольцо в нулевом положении

В стеклянную трубку помещают 10 мл воды и погружают ее вертикально в водяную баню с температурой $(36,5 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ на глубину не менее 7 см ниже поверхности воды, но так, чтобы она не касалась дна водяной бани. В трубку заостренным концом вниз помещают суппозиторий, затем вводят стержень до тех пор, пока металлическая игла не коснется основания суппозитория. С этого момента включают секундомер. Регистрируют время, необходимое для достижения иглой стержня дна стеклянной трубки, соответствующего нулевому положению маркировочного кольца.

Прибор 2 (рис. 2) состоит из водяной бани (А) с крышкой, в которую вставлены термометр (Б) и стеклянная трубка (В) с капиллярным переходом, закрытая пробкой с короткого конца, и вставки (Г).

В качестве вставки могут быть использованы:

- стеклянный стержень (Г1) в форме трубки, запаянной с обоих концов, имеющий свинцовый ободок на нижнем конце. Масса стержня

$30 \pm 0,4$ г;

– проникающая вставка (Г2), состоящая из стержня массой $7,5 \pm 0,1$ г в штоке, который имеет расширение книзу для крепления суппозитория; обе части изготовлены из нержавеющей стали.

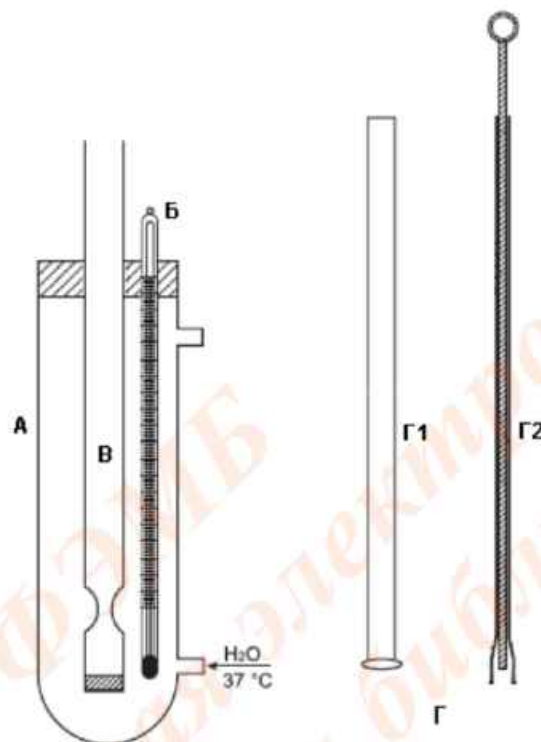


Рис. 2 – Прибор 2

А – водяная баня; Б – термометр; В – стеклянная трубка;
Г1 – стеклянный стержень; Г2 – проникающая вставка

Методика. Устанавливают и поддерживают температуру водяной бани $(36,5 \pm 0,5)$ °С. В трубку (В) помещают 5 мл воды, нагретой до $(36,5 \pm 0,5)$ °С, суппозиторий заостренным концом вниз и вводят вставку (Г1 или Г2). При помощи секундомера регистрируют время, необходимое для достижения нижним краем вставки суженной части стеклянной трубки.

**Прочность таблеток на
раздавливание**

ОФС.1.4.2.0011.15

Вводится впервые

Испытание позволяет определить устойчивость таблеток к давлению при определенных условиях путем измерения силы, необходимой для разрушения таблеток.

Определение и нормирование механической прочности таблеток необходимо как в условиях промышленного производства (например, процесс покрытия таблеток и фасовка), так и для обеспечения потребительских свойств препарата (сохранение целостности таблетки при извлечении из упаковки).

Оборудование. Прибор представляет собой два расположенных друг против друга зажима, один из которых может перемещаться по направлению к другому. Плоскости поверхностей зажимов перпендикулярны направлению движения. Допускается использование прибора, в котором оба зажима могут перемещаться с постоянной скоростью по направлению друг к другу. Сдавливающие поверхности зажимов должны быть плоскими и превосходить по размеру зону контакта с таблеткой. Прибор должен обеспечивать прекращение сдавливания при любом нарушении целостности таблеток.

Прибор калибруют с использованием системы, обеспечивающей точность 1 Н (ньютон).

Методика. Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, таблетку помещают между зажимами ребром по отношению к движущейся части прибора. Таблетку, поставленную на ребро, сжимают до разрушения. Измерения проводят для 10 таблеток. Перед каждым измерением тщательно удаляют все фрагменты предыдущей таблетки.

Если на таблетке есть разделительная линия (риска) или надпись, каждая таблетка должна быть ориентирована одинаково по отношению к направлению прилагаемой силы.

Таблетки овальной или продолговатой формы помещают между зажимами длинным ребром перпендикулярно по отношению к сдавливающим поверхностям прибора (вдоль направления прилагаемой нагрузки), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Представление результатов. Указывают среднее, минимальное и максимальное значения измеренной силы в ньютонах (Н), а также тип использованного прибора и, при необходимости, ориентацию таблеток.

Таблетки круглой формы должны иметь прочность не ниже значений, приведенных в таблице, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Таблица – Минимально допустимая прочность в зависимости от диаметра таблеток

Диаметр, мм	6	7	8	9	10	11	12	13
Прочность, Н	30	30	30	30	40	40	50	50

Данные, приведенные в таблице, носят рекомендательный характер.

Испытание предназначено для определения способности суппозиториев и вагинальных таблеток размягчаться или распадаться в жидкой среде за определенный промежуток времени в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации.

Оборудование. Прибор (рис. 1) состоит из прозрачного стеклянного или пластмассового полого цилиндра с соответствующей толщиной стенок, внутри которого с помощью трех держателей закреплено металлическое устройство. Устройство представляет собой 2 перфорированных диска из нержавеющей металла, закрепленных на расстоянии около 30 мм друг от друга. Диаметр дисков почти равен внутреннему диаметру цилиндра, и в каждом диске имеется 39 отверстий диаметром 4 мм.

Испытания проводят, используя 3 таких прибора, каждый из которых содержит отдельный образец. Каждый прибор помещают в сосуд с термостатирующим устройством, вместимостью не менее 4 л, заполненный жидкой средой.

В качестве жидкой среды используют воду, нагретую до $(36,5 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сосуд снабжен медленно движущейся мешалкой и устройством, которое поддерживает прибор в вертикальном положении ниже поверхности жидкой среды не менее чем на 90 мм и дает возможность переворачивать его на 180° , не вынимая из среды.

Три прибора могут быть также помещены вместе в один сосуд вместимостью не менее 12 л.

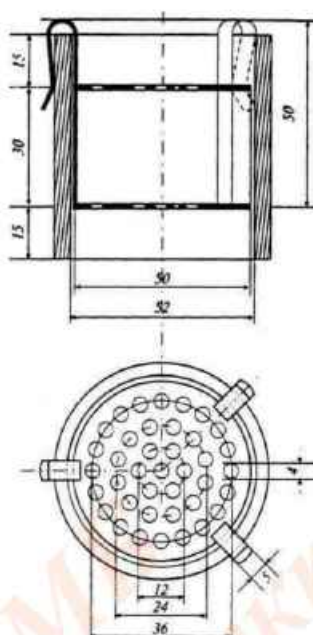


Рис. 1 – Прибор для определения распадаемости суппозиторий
Размеры указаны в миллиметрах

Методика испытания для суппозиторий. Испытание проводят на трех суппозиториях. Каждый образец помещают на нижний диск устройства, устанавливают устройство в цилиндр прибора и закрепляют его. Помещают прибор в сосуд с жидкой средой и начинают испытание. Приборы переворачивают каждые 10 мин.

По истечении времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, исследуют состояние анализируемых образцов.

Препарат выдерживает испытание, если все образцы распались.

Методика испытания для вагинальных таблеток. Используют описанный выше прибор, установленный на держателях (рис. 2). Прибор помещают в лабораторный стакан подходящего диаметра, заполненный жидкой средой, при этом поверхность жидкой среды должна находиться немного ниже верхнего перфорированного диска. Затем с помощью пипетки прибав-

ляют указанную жидкую среду до тех пор, пока перфорации диска не покроются лишь тонким слоем жидкой среды.

Испытание проводят на трех вагинальных таблетках. Каждую в отдельности помещают на верхний диск устройства, накрывают прибор стеклянной пластинкой, чтобы поддержать соответствующие условия влажности.

По истечении времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, исследуют состояние анализируемых образцов.

Препарат выдерживает испытание, если все образцы распались.

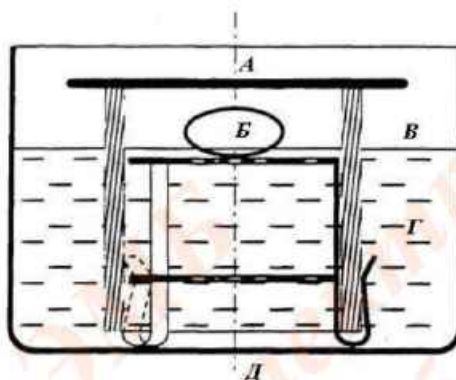


Рис. 2 – Прибор для определения распадаемости вагинальных таблеток
А – стеклянная пластинка; Б – вагинальная таблетка; В – поверхность воды;
Г – вода; Д – стакан

Интерпретация результатов. Распавшимися образцы считаются, если:

а) образцы полностью растворились;

б) наблюдается разделение компонентов суппозитория: расплавленные липофильные вещества распределились на поверхности жидкой среды, нерастворимые компоненты осели на дно, а растворимые – растворились; в зависимости от состава и способа получения компоненты могут распределяться по одному или нескольким из указанных путей;

в) размягчение образца сопровождается заметным изменением формы, без полного разделения компонентов; размягчением считается также отсутствие у суппозитория твердого ядра, оказывающего сопротивление давлению стеклянной палочки;

г) на перфорированном диске не осталось осадка, или оставшийся осадок состоит только из мягкой или пенообразной массы, не имеющей твердого

ядра, оказывающего сопротивление давлению стеклянной палочки (вагинальные таблетки).

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Испытание предназначено для определения способности таблеток и капсул распадаться в жидкой среде за определенный промежуток времени в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации.

Оборудование. Прибор для определения распадаемости состоит из сборной корзинки, стеклянного сосуда для жидкости вместимостью 1 л, термостатического устройства, поддерживающего температуру жидкости в пределах $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, и электромеханического устройства, сообщающего корзинке возвратно-поступательное движение на расстоянии не менее 50 и не более 60 мм в вертикальной плоскости при частоте 28-32 цикла в 1 мин.

Основную часть прибора составляет сборная корзинка с 6 цилиндрическими стеклянными трубками длиной $77,5 \pm 2,5$ мм с внутренним диаметром $21,85 \pm 1,15$ мм и толщиной стенки $1,9 \pm 0,9$ мм. Трубки поддерживаются в вертикальном положении сверху и снизу двумя накладными пластмассовыми пластинами диаметром 90 ± 2 мм, толщиной $6,75 \pm 1,75$ мм с 6 отверстиями, каждое диаметром 24 ± 2 мм. Отверстия равноудалены от центра пластины и находятся на равном расстоянии друг от друга. К нижней поверхности нижней пластины прикреплена сетка с отверстиями размером $2,0 \pm 0,2$ мм из нержавеющей стальной проволоки диаметром $0,615 \pm 0,045$ мм. Пластины удерживаются жестко относительно друг друга вертикальными металлическими стержнями по окружности. Еще один металлический стержень прикреплен к центру верхней пластины, что позволяет прикрепить корзинку к

механическому устройству, которое может поднимать и опускать ее. Время, требующееся для движения вверх, равно времени движения вниз; изменение направления движения происходит плавно.

Корзинка движется вертикально вдоль оси. Не должно быть заметного смещения оси в горизонтальной плоскости.

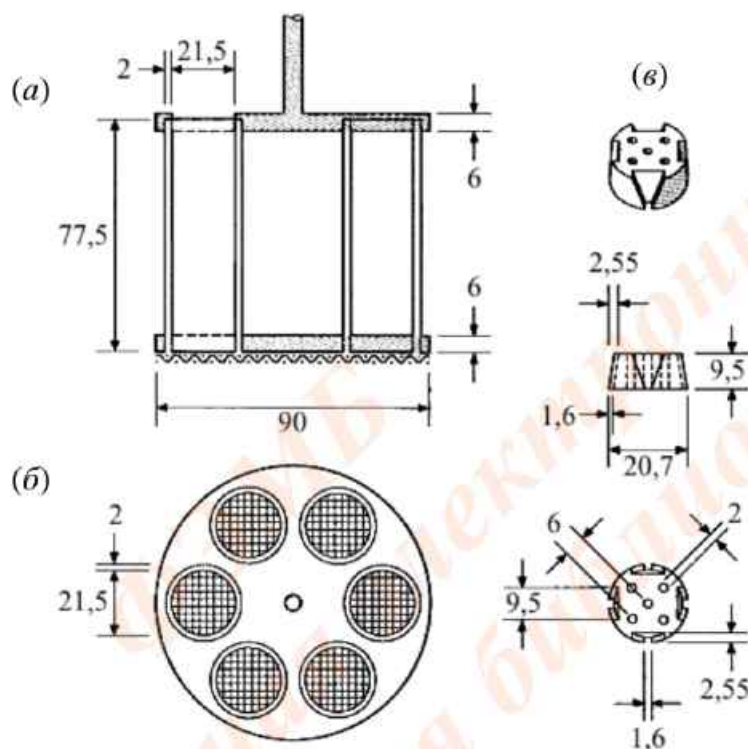


Рисунок – Устройство и размеры составных частей прибора для определения распадаемости таблеток и капсул

Размеры указаны в миллиметрах

a – корзинка; б – сетчатое дно-подставка корзинки; в – диск

В конструкции прибора предусмотрено использование дисков. При этом каждая стеклянная трубка снабжается диском цилиндрической формы диаметром $20,7 \pm 0,15$ мм и высотой $9,5 \pm 0,15$ мм (рисунок, в), изготовленным из прозрачной пластмассы с плотностью от 1,18 до 1,20 г/см³. В диске просверлены 5 параллельных отверстий диаметром $2,0 \pm 0,1$ мм; одно из них расположено в центре диска, остальные 4 – равномерно по кругу радиусом $6,0 \pm 0,2$ мм от центра диска. На боковой поверхности диска вырезаны 4 выемки трапецевидной симметричной формы, практически перпендикулярные

верхней и нижней поверхностям диска. Параллельные стороны выемки совпадают с краями диска и параллельны воображаемой линии, соединяющей два соседних отверстия, расположенных по кругу. Длина параллельной стороны трапеции на нижней поверхности диска составляет $1,6 \pm 0,1$ мм, выемка имеет форму квадрата. Длина параллельной стороны трапеции на верхней поверхности диска составляет $9,4 \pm 0,2$ мм и ее середина находится на расстоянии $2,6 \pm 0,1$ мм от окружности диска. Все поверхности диска гладкие.

Применение дисков оговаривается в фармакопейной статье или нормативной документации.

Корзинку помещают в стакан, высота которого составляет 149 ± 11 мм, внутренний диаметр – 106 ± 9 мм. Объем жидкости должен быть таким, чтобы при подъеме корзинки в крайнее верхнее положение сетка находилась ниже поверхности жидкости не менее чем на 15 мм, а при опускании корзинки в крайнее нижнее положение – на 25 мм выше дна сосуда, и верхние открытые концы стеклянных трубок – над поверхностью жидкости.

Конструкция корзинки может изменяться при условии соблюдения указанных выше требований для стеклянных трубок и проволоочной сетки.

Методика. Для проведения испытания отбирают 18 образцов таблеток (или капсул), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. В каждую из 6 трубок помещают по одному образцу и, если предписано, диск. Опускают корзинку в сосуд с жидкостью, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, и включают прибор. По истечении установленного времени корзинку вынимают и исследуют состояние таблеток и капсул. Все образцы должны полностью распасться. Если 1 или 2 образца не распались, повторяют испытание на оставшихся 12 образцах. Не менее 16 из 18 образцов должны полностью распасться.

Интерпретация результатов. Образец считается полностью распавшимся, когда кроме фрагментов нерастворимой оболочки таблетки (капсулы), находящихся на сетке или прилипших к нижней поверхности диска, если использовались диски, нет никакого остатка или остаток представляет со-

бой мягкую массу, которая разрушается при легком прикосновении стеклянной палочки. Наличие такого остатка должно быть оговорено в фармакопейной статье или нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Растворение для твердых
дозированных лекарственных форм**

ОФС.1.4.2.0014.15

**Взамен ст. ГФ XI, вып. 2,
ОФС 42-0003-04**

Испытание «Растворение» предназначено для определения количества действующего вещества, которое в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, за определенный промежуток времени должно высвободиться в среду растворения из твердой дозированной лекарственной формы.

В фармакопейной статье или нормативной документации на конкретную твердую дозированную лекарственную форму указывают:

- тип аппарата;
- среду растворения – состав и объем;
- скорость вращения мешалки для аппаратов I и II или скорость потока среды растворения для аппарата III;
- время отбора проб;
- аналитический метод количественного определения действующего вещества или действующих веществ, высвободившихся в среду растворения;
- количество действующего вещества, которое должно высвободиться в среду растворения за нормируемое время, выраженное в процентах от заявленного содержания.

Испытание «Растворение» проводится при контроле качества лекарственной формы для подтверждения постоянства ее свойств и надлежащих условий производственного процесса.

В зависимости от скорости высвобождения действующих веществ все твердые дозированные лекарственные формы подразделяются на группы:

1 группа: таблетки; таблетки, покрытые оболочкой; гранулы (время растворения которых превышает 5 мин); гранулы, покрытые оболочкой; капсулы;

2 группа: таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой; кишечнорастворимые капсулы, гранулы и другие кишечнорастворимые твердые дозированные лекарственные формы;

3 группа: таблетки, капсулы и гранулы с пролонгированным высвобождением.

Испытание «Растворение» для многокомпонентных твердых дозированных лекарственных форм допускается проводить по наименее растворимому действующему веществу.

Оборудование

Выбор аппарата зависит от физико-химических свойств твердой дозированной лекарственной формы.

Все части аппарата, которые могут контактировать с лекарственным средством и средой растворения, должны быть химически инертными и не влиять на результаты анализа. Металлические части аппарата должны быть изготовлены из нержавеющей стали или покрыты соответствующим материалом, чтобы гарантировать отсутствие их взаимодействия со средой растворения или действующим веществом.

Не должно быть частей аппарата или условий его сборки, которые могли бы вызвать вибрацию, движение или перемещение во время работы, кроме равномерного вращения перемешивающего устройства.

Аппараты для растворения должны соответствовать геометрическим и техническим параметрам, предусмотренным настоящей общей фармакопейной статьей.

Аппарат I «Вращающаяся корзинка»

Аппарат I (рис. 1) состоит из:

– сосуда для растворения (*B*) с полусферическим дном, изготовленного из боросиликатного стекла или другого подходящего прозрачного инертного материала. Номинальная вместимость сосуда для растворения составляет 1000 мл; высота – 185 ± 25 мм; внутренний диаметр – 102 ± 4 мм;

– двигателя с регулятором скорости, поддерживающим скорость вращения корзинки в пределах ± 4 % от скорости вращения корзинки, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации;

– перемешивающего элемента, который состоит из вертикального вала (*A*), к нижней части которого прикреплена цилиндрическая корзинка (*B*). Ось вращения вала не должна отклоняться от вертикальной оси сосуда более чем на 2 мм. Вращение вала должно быть плавным, без существенных колебаний.

Корзинка состоит из двух частей: верхняя часть, имеющая отверстие диаметром $2,0 \pm 0,5$ мм, должна быть приварена к валу и снабжена 3 упругими зажимами или другим подходящим приспособлением, позволяющим удалять нижнюю часть корзинки для введения испытуемого лекарственного средства. Съемная часть корзинки сделана из сваренной прямым швом металлической проволоочной сетки, в которой проволока диаметром 0,21-0,31 мм образует отверстия размером 0,36-0,44 мм. Сетка имеет форму цилиндра и сверху и снизу ограничена металлической оправой.

При использовании агрессивных кислых растворов может использоваться корзинка, покрытая слоем золота толщиной 2,5 мкм.

Расстояние между дном сосуда для растворения и корзинкой должно составлять от 23 до 27 мм.

Для предотвращения испарения среды растворения сосуда для растворения должны закрываться крышками с центральным отверстием для прохождения оси корзинки, а также с отверстиями для термометра и отбора проб.

Для поддержания температуры среды растворения ($37 \pm 0,5$) °C аппарат должен быть оснащен водяной баней с постоянным объемом термостатируемой жидкости.

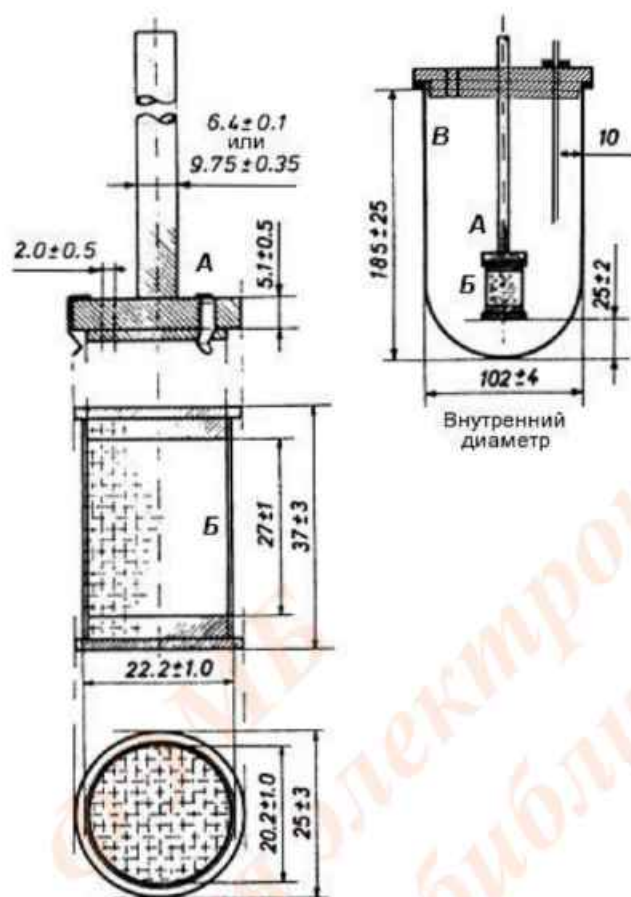


Рис. 1 – Аппарат I «Вращающаяся корзина»
Размеры указаны в мм

Аппарат II «Лопастная мешалка»

Аппарат II состоит из тех же частей, что и аппарат I.

Отличие аппарата II заключается в использовании в качестве перемешивающего элемента лопастной мешалки (рис. 2) вместо вращающейся корзины.

Металлическая мешалка и металлический стержень представляют собой единый элемент.

Нижний край лопасти мешалки должен находиться на расстоянии от 23 до 27 мм от дна сосуда для растворения.

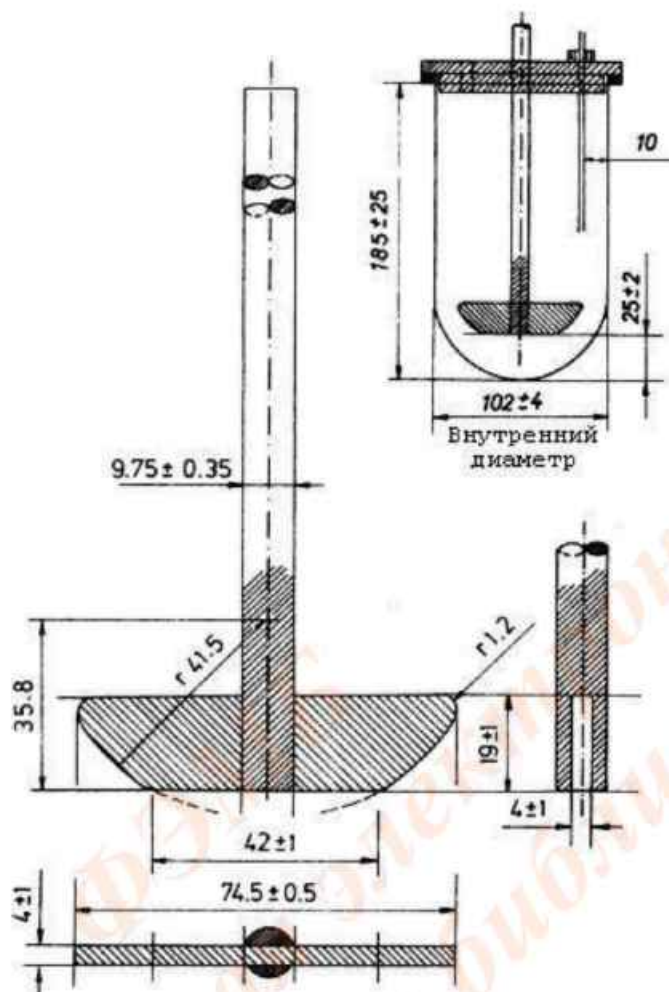


Рис. 2 – Аппарат II «Лопастная мешалка»
Размеры указаны в мм

Аппарат III «Проточная ячейка»

Аппарат III (рис. 3) состоит из:

- резервуара для среды растворения;
- насоса с синусоидальным профилем скорости 120 ± 10 импульсов/мин, перекачивающего среду растворения через проточную ячейку; скорость потока среды растворения не должна превышать $\pm 5 \%$;
- проточной ячейки (рис. 3-5) из прозрачного инертного материала, установленной вертикально над фильтрующей системой, предотвращающей продвижение нерастворенных частиц к верхней части ячейки. Стандартные диаметры ячеек составляют 12,0 и 22,6 мм. Размер ячейки, характеристики

фильтрующей системы, скорость потока среды растворения должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации;

– водяной бани, поддерживающей температуру среды растворения в диапазоне значений $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

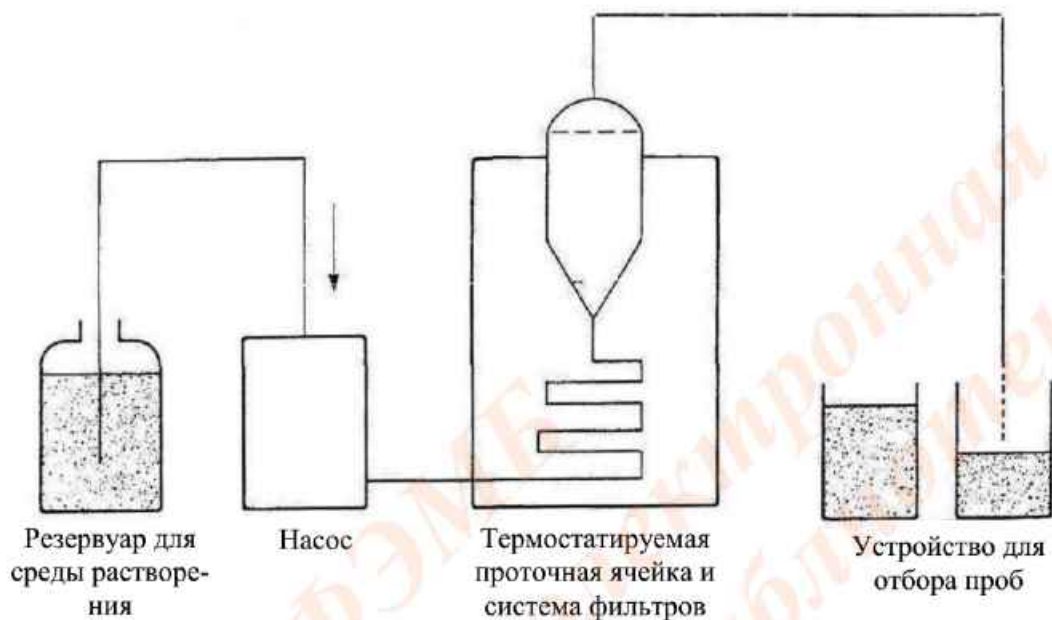


Рис. 3 – Схема аппарата III «Проточная ячейка»

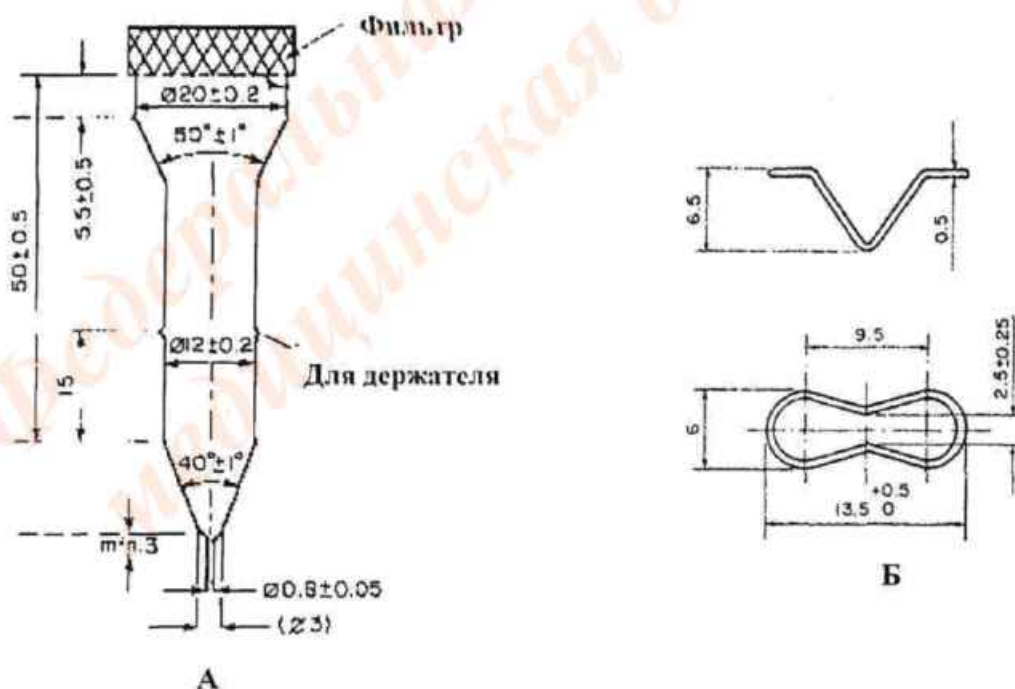


Рис. 4 – Проточная ячейка размером 12,0 мм (А) и держатель таблеток для проточной ячейки размером 12,0 мм (Б)

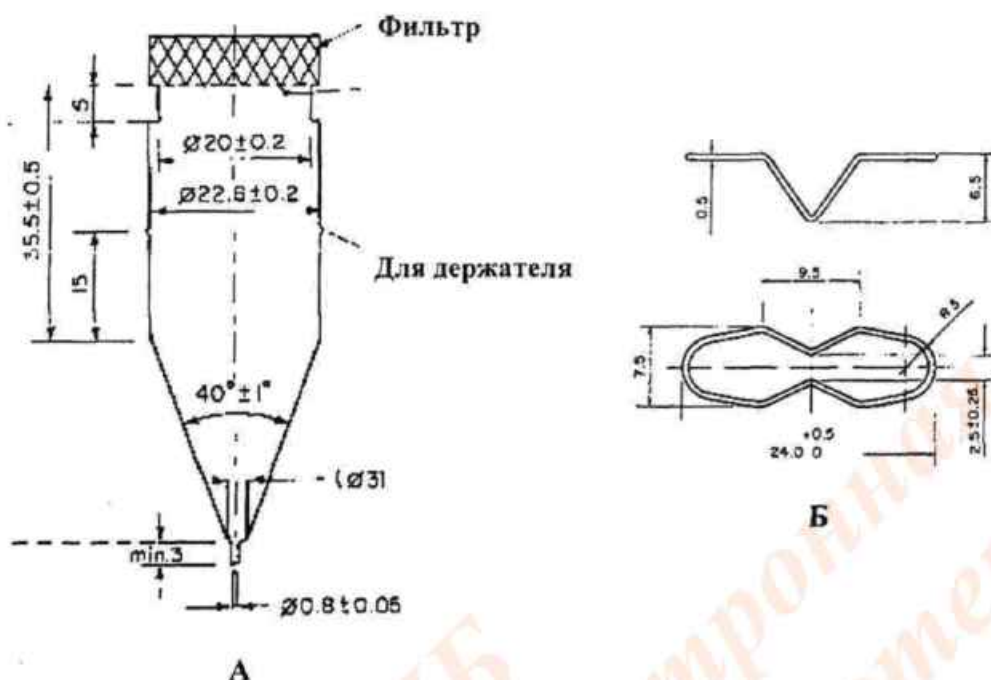


Рис. 5 – Проточная ячейка размером 22,6 мм (А) и держатель таблеток для проточной ячейки размером 22,6 мм (Б)

Примечание. При проведении испытания по показателю «Растворение» могут быть использованы другие аппараты, описанные в зарубежных фармакопеях, основные характеристики которых должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Среда растворения

В качестве среды растворения могут применяться: вода очищенная, хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, буферные растворы с рН 6,8-7,8 (допустимое отклонение значений рН $\pm 0,05$), а также другие растворы, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации. Если твердые или мягкие желатиновые капсулы или таблетки, покрытые оболочкой, в состав которых входит желатин, не отвечают требованиям испытания по показателю «Растворение», когда в качестве среды растворения используется вода или среды с рН менее 6,8, то испытание проводится повторно в той же среде с добавлением очищенного пепсина (активностью не более 750000 Ед на 1 л), или, если в качестве среды используются вода и среды с рН более 6,8, испытание повторяется в той же среде с добавлением панкреатина (активно-

стью не более 1750 Ед протеазной активности на 1 л). Условия проведения повторного испытания должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации.

Значение pH среды растворения не должно превышать 7,8, если иное не обосновано на стадии разработки испытания.

Использование водных растворов с добавлением ферментов, поверхностно-активных веществ (например, натрия додецилсульфата, твина-80 и др.) или органических растворителей должно быть обосновано на стадии разработки испытания. Использование органических растворителей не рекомендуется.

Для плохо растворимых веществ рекомендуется использовать среду растворения, содержащую поверхностно-активные вещества.

Объем среды растворения для аппаратов «Вращающаяся корзинка» и «Лопастная мешалка», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, обычно составляет 900 мл, но не должен быть менее 500 мл.

Температура среды растворения должна контролироваться на протяжении всего исследования и составлять $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Перед использованием среда растворения должна быть деаэрирована. Для этого среду растворения нагревают до температуры около $41 ^\circ\text{C}$, осторожно перемешивая, сразу же фильтруют под вакуумом через фильтр с размером пор не более 0,45 мкм, энергично перемешивая. После фильтрования продолжают воздействие вакуумом в течение 5 мин.

Для деаэрирования может использоваться любой другой валидированный метод удаления газов.

Необходимость деаэрирования среды растворения подтверждается экспериментально. Если деаэрирование не влияет на процесс высвобождения действующего вещества в среду растворения, то это должно быть оговорено в фармакопейной статье или нормативной документации.

Скорость вращения мешалки

Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то скорость вращения мешалки должна составлять 100 об/мин (для аппарата «Вращающаяся корзинка») или 50 об/мин (для аппарата «Лопастная мешалка»).

Допустимое отклонение скорости вращения перемешивающего устройства не должно превышать $\pm 4\%$ от скорости вращения, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Отбор проб

Отбор проб осуществляется из зоны сосуда для растворения, находящейся на $\frac{1}{2}$ расстояния между поверхностью среды растворения и верхней частью съемного элемента корзинки или лопасти мешалки и на расстоянии не менее 1 см от стенок сосуда для растворения.

Время отбора проб должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации и должно соблюдаться с точностью $\pm 2\%$.

Для препаратов *1 группы*, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, время отбора проб – через 45 мин после начала испытания.

Для препаратов *2 группы* должны быть указаны 2 отдельных нормируемых временных интервала – для кислотной стадии и щелочной стадии.

Для препаратов *3 группы* должно быть указано не менее 3 временных интервалов.

После каждого отбора пробы объем среды растворения должен быть возмещен тем же растворителем в объеме, равном объему отобранной аликвоты. Если предварительными исследованиями показано, что пополнение среды растворения не является обязательным, убыль среды растворения должна учитываться при расчете количества лекарственного средства, высвободившегося в среду растворения.

Аликвота раствора, отобранная из среды растворения, сразу же фильтруется через инертный фильтр, который не должен абсорбировать дейст-

вующее вещество из раствора и содержать вещества, способные экстрагироваться средой растворения. Размер пор фильтра должен составлять не более 0,45 мкм, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Не допускается центрифугирование аликвоты.

Аналитический метод количественного определения действующего вещества в растворе должен быть описан в фармакопейной статье или нормативной документации и валидирован в соответствии с установленными требованиями.

Если оболочка капсулы влияет на результаты анализа, то определяют фактор коррекции (поправку), для чего проводят испытание «Растворение» на капсулах, используемых при производстве данной лекарственной формы, не содержащих действующего вещества. Фактор коррекции учитывается при расчете содержания действующего вещества, высвободившегося в среду растворения. Фактор коррекции не должен превышать 25 % от заявленного содержания действующего вещества.

Когда аналитический метод определения содержания действующего вещества в растворе не позволяет оценить растворение из одной единицы твердой дозированной лекарственной формы, допустимо проводить испытание с использованием нескольких единиц данной лекарственной формы («Объединенный образец») на каждый сосуд для растворения.

Методика испытания

В сосуд аппарата для растворения помещают определенный объем среды растворения. Доводят температуру среды растворения до $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

При использовании аппарата «Вращающаяся корзинка», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают по одной единице лекарственной формы в каждую из 6 сухих корзинок аппарата. Опускают корзинки в среду растворения и включают мотор, вращающий перемешивающее устройство.

При использовании аппарата «Лопастная мешалка», если нет других

указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, по одной единице лекарственной формы помещают непосредственно в каждый из 6 сосудов со средой растворения до начала вращения мешалки. Для предотвращения всплывания таблеток и капсул на поверхность среды растворения комплектность аппарата должна предусматривать соответствующее грузило в виде проволоки из инертного материала или стеклянной спирали, удерживающее таблетки или капсулы на дне сосуда. Допускается использование других альтернативных грузил. Необходимо соблюдать осторожность для того, чтобы избежать оседания пузырьков воздуха на поверхности таблетки или капсулы.

При использовании аппарата «Проточная ячейка» помещают 1 шарик диаметром $5,0 \pm 0,5$ мм и затем стеклянные шарики подходящего размера, обычно $1,0 \pm 0,1$ мм (входят в комплект аппарата), на дно конической части проточной ячейки для предотвращения прохождения жидкости в трубку. Единицу лекарственной формы, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в ячейку или непосредственно в слой стеклянных шариков. Закрывают аппарат фильтрующей системой.

Для твердых дозированных лекарственных форм 2 группы может использоваться одна из 2 альтернативных методик проведения испытания «Растворение». Ссылка на используемую методику приводится в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика 1

Испытание проводят в две стадии.

1-я стадия (кислотная). По 750 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в каждый из 6 сосудов для растворения. Доводят температуру среды растворения до $(37 \pm 0,5)$ °С. Помещают по 1 таблетке или по 1 капсуле, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, в каждый из 6 сосудов для растворения,

включают мотор перемешивающего устройства. Через 2 ч, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, отбирают аликвоту и сразу же продолжают процесс растворения в щелочной среде, как описано ниже.

Отобранную аликвотную часть раствора анализируют по методике, описанной в фармакопейной статье или нормативной документации. Результаты испытаний на 1-й стадии считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, перешедшего в среду растворения, соответствует критериям раздела «Интерпретация результатов» (табл. 1).

2-я стадия (щелочная). В каждый из 6 сосудов для растворения прибавляют по 250 мл натрия фосфата раствора 0,2 М ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), температура которого составляет $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (перемешивающее устройство аппарата продолжает работать). Доводят pH среды растворения до $6,80 \pm 0,05$ с помощью хлористоводородной кислоты раствора 2 М или натрия гидроксида раствора 2 М.

Продолжают процесс растворения в течение 45 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. После отбора пробы раствора проводят определение содержания действующего вещества в растворе по методике, описанной в фармакопейной статье или нормативной документации. Результаты испытаний на 2-й стадии считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, перешедшего в среду растворения, соответствует критериям раздела «Интерпретация результатов» (табл. 1).

Примечание. Процедура добавления натрия фосфата раствора 0,2 М и доведения pH среды растворения до заданного значения должна проводиться в течение не более 5 мин.

Методика 2

Испытание проводят в две стадии.

1-я стадия (кислотная). По 1000 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в каждый из 6 сосудов для растворения.

Доводят температуру среды растворения до $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Помещают по 1 таблетке или по 1 капсуле, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, в каждый из 6 сосудов для растворения, включают мотор перемешивающего устройства. Через 2 ч, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, отбирают аликвоту и сразу же продолжают процесс растворения в щелочной среде, как описано ниже.

Отобранную аликвотную часть раствора анализируют по методике, описанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Результаты испытаний на 1-й стадии считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, перешедшего в среду растворения, соответствует критериям раздела «Интерпретация результатов» (табл. 2).

2-я стадия (щелочная). Из каждого сосуда для растворения удаляют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М и помещают по 1000 мл фосфатного буферного раствора рН 6,8 (2) с температурой $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Допустимо переносить испытуемые единицы твердой дозированной лекарственной формы из сосудов для растворения, содержащих хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, в сосуды для растворения, содержащие по 1000 мл фосфатного буферного раствора рН 6,8 (2) с температурой $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Процесс растворения продолжают в течение 45 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Затем отбирают аликвоту и сразу же анализируют по методике, описанной в фармакопейной статье или нормативной документации. Результаты испытания на 2-й стадии считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, соответствует критериям раздела «Интерпретация результатов» (табл. 2).

Примечание. Приготовление фосфатного буферного раствора рН 6,8 (2). Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М и натрия фосфата раствор 0,2 М ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) смешивают в соотношении 3:1 и при необходимости доводят рН полученного раствора до $6,80 \pm 0,05$ с помощью хлори-

стородной кислоты раствора 2 М или натрия гидроксида раствора 2 М.

Для твердых дозированных лекарственных форм 3 группы аппарат, методика испытания и аналитический метод определения содержания действующего вещества в растворе должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Интерпретация результатов

1 группа. Таблетки; таблетки, покрытые оболочкой; капсулы.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, имеющую температуру $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, в течение 45 мин при скорости вращения корзинки 100 об/мин или скорости вращения лопастной мешалки 50 об/мин должно составлять не менее 75 % (Q) от заявленного содержания.

Испытание проводят на 6 единицах или 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, соответствует критериям, приведенным в табл. 1, стадия S_1 .

Если при этом хотя бы один результат не соответствует норме, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, то испытание «Растворение» повторяют еще на 6 единицах или 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 1, стадия S_2 .

Если при повторном испытании результаты не соответствуют установленным критериям, испытание повторяют на 12 дополнительных единицах или 12 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 1, стадия S_3 .

При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации серия бракуется, если ни на одной из стадий исследования результаты испытания не удовлетворяют установленным критериям.

Таблица 1 – Интерпретация результатов испытания «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм *1 группы*

Ста- дия	Число ис- пытываемых образцов	Одна единица лекарст- венной формы	Объединенный образец
S_1	6	Для каждой испытываемой единицы: в среду растворения должно высвободиться не менее $Q + 5\%$ от заявленного содержания действующего вещества	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества для каждой единицы лекарственного средства из 6 объединенных образцов должно быть не менее $Q + 10\%$ от заявленного содержания действующего вещества
S_2	6	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 12 испытываемых единиц лекарственной формы ($S_1 + S_2$) должно быть не менее Q и не должно быть ни одной единицы, где в среду растворения перешло бы менее $Q - 15\%$ от заявленного содержания действующего вещества	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества для каждой единицы лекарственного средства из 12 объединенных образцов ($S_1 + S_2$) должно быть не менее $Q + 5\%$ от заявленного содержания действующего вещества
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытываемых единиц лекарственной формы ($S_1 + S_2 + S_3$) должно быть не менее Q ; только для 2 единиц может быть менее $Q - 15\%$, и ни для одной единицы не должно быть менее $Q - 25\%$ от заявленного содержания действующего вещества	Среднее количество перешедшего в среду растворения действующего вещества для каждой единицы лекарственного средства из 24 объединенных образцов ($S_1 + S_2 + S_3$) должно быть не менее Q от заявленного содержания действующего вещества

2 группа. Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой; кишечнорастворимые капсулы и другие кишечнорастворимые твердые дозиро-

ванные лекарственные формы.

Испытание проводят на 6 единицах или на 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы для каждой стадии (кислотной и щелочной).

Результаты испытания на каждой стадии считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, соответствует критериям, приведенным в табл. 2, стадия S_1 .

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, значение Q считают равным 75 %.

Если при этом хотя бы один результат не соответствует норме, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, то испытание «Растворение» повторяют еще на 6 единицах или 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 2, стадия S_2 .

Если при повторном испытании результаты не соответствуют установленным критериям, испытание повторяют на 12 дополнительных единицах или 12 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 2, стадия S_3 .

При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации серия бракуется, если ни на одной из стадий исследования результаты испытания не удовлетворяют установленным критериям.

Таблица 2 – Интерпретация результатов испытания «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм 2 группы

Стадия	Число испытываемых образцов	Одна единица или объединенный образец
1-я стадия (кислотная)		
S_1	6	Для каждой испытываемой единицы: в среду растворения должно высвободиться не более 10 % от заявленного содержания действующего вещества

Стадия	Число испытуемых образцов	Одна единица или объединенный образец
S_2	6	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 12 испытуемых единиц ($S_1 + S_2$) не должно быть более 10 % от заявленного содержания действующего вещества и не должно быть ни одной единицы, количество высвободившегося действующего вещества из которой превышает 25 % от заявленного содержания
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытуемых единиц ($S_1 + S_2 + S_3$) не должно быть более 10 % от заявленного содержания действующего вещества и не должно быть ни одной единицы, количество высвободившегося действующего вещества из которой превышает 25 % от заявленного содержания
2-я стадия (щелочная)		
S_1	6	Для каждой испытуемой единицы: в среду растворения должно высвободиться не менее $Q + 5$ % от заявленного содержания действующего вещества
S_2	6	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 12 испытуемых единиц ($S_1 + S_2$) должно быть не менее Q и не должно быть ни одной единицы, где в среду растворения высвободилось бы менее $Q - 15$ % от заявленного содержания действующего вещества
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытуемых единиц ($S_1 + S_2 + S_3$) должно быть не менее Q ; только для 2 единиц может быть менее $Q - 15$ %, и ни для одной единицы не должно быть менее $Q - 25$ % от заявленного содержания действующего вещества

3 группа. Таблетки и капсулы с пролонгированным высвобождением.

Испытание проводят на 6 единицах или 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, соответствует критериям, приведенным в табл. 3, стадия S_1 .

Если при этом хотя бы один результат не соответствует норме, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, то испытание

«Растворение» повторяют еще на 6 единицах или 6 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 3, стадия S_2 .

Если при повторном испытании результаты не соответствуют установленным критериям, испытание повторяют на 12 дополнительных единицах или 12 объединенных образцах твердой дозированной лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно табл. 3, стадия S_3 .

Если ни на одной из стадий исследования результаты испытания не удовлетворяют установленным критериям, серия бракуется.

Таблица 3 – Интерпретация результатов испытания «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм 3 группы

Стадия	Число испытываемых образцов	Одна единица или объединенный образец
1	2	3
S_1	6	Не должно быть ни одной испытываемой единицы, для которой количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества находится за пределами установленных диапазонов и менее значения, установленного для конечного времени испытания
S_2	6	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 12 испытываемых единиц ($S_1 + S_2$) должно лежать в пределах установленных диапазонов и должно быть не менее значения, установленного для конечного времени испытания. Ни одно индивидуальное значение не должно больше чем на 10 % от заявленного содержания выходить за пределы установленных диапазонов и быть более чем на 10 % от заявленного содержания ниже значения, установленного для конечного времени испытания
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытываемых единиц ($S_1 + S_2 + S_3$) должно лежать в пределах установленных диапазонов и должно быть не менее значения, установленного для конечного времени испытания. Не более чем для 2 из 24 единиц количество высвободившегося вещества может более чем на 10 % от заявленного содержания выходить за пределы установленных диапазонов и быть более чем на 10 % от заявленного содержания ниже значения, установленного для конечного времени испытания. Ни для одной единицы количество высвободившегося веще-

		ства не должно более чем на 20 % от заявленного содержания выходить за пределы установленных диапазонов и быть более чем на 20 % от заявленного содержания ниже значения, установленного для конечного времени испытания
--	--	--

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Растворение для суппозиториев
на липофильной основе**

ОФС.1.4.2.0015.15

Вводится впервые

Данное испытание предназначено для определения количества действующего вещества, которое за определенный промежуток времени должно высвободиться в среду растворения из суппозиториев на липофильной основе.

Условия проведения данного испытания указываются в фармакопейной статье или нормативной документации на суппозитории на липофильной основе, а именно:

- среда растворения – состав и объем;
- скорость потока среды растворения;
- температура среды растворения;
- объем пробы;
- время отбора проб;
- аналитический метод количественного определения действующего вещества или действующих веществ, высвободившихся в среду растворения;
- количество действующего вещества, которое должно высвободиться в среду растворения за нормируемое время, выраженное в процентах от заявленного содержания.

Оборудование

Используется прибор «Проточная ячейка» (рис. 1), который состоит из:

- резервуара для среды растворения, помещённого на водяную баню;

- водяной бани, поддерживающей температуру среды растворения в диапазоне значений $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- насоса, перекачивающего среду растворения через проточную ячейку;
- термостатируемой проточной ячейки с системой фильтров;
- устройства для отбора проб.

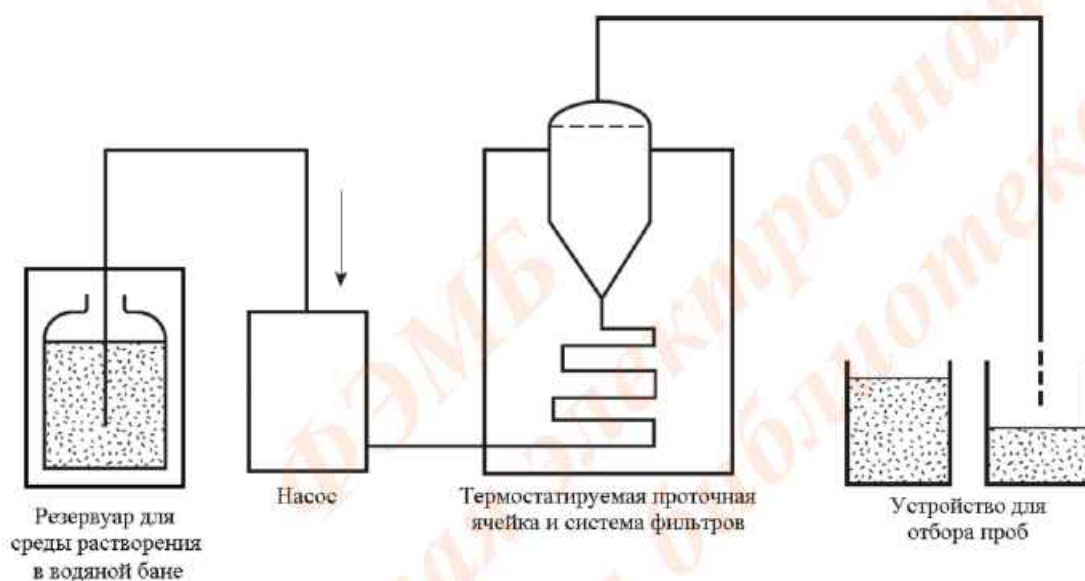


Рис. 1 – Схема прибора «Проточная ячейка»

Проточная ячейка состоит из 3 прозрачных частей, вставляемых одна в другую (рис. 2):

- I. Нижняя часть состоит из 2 смежных камер (А и Б), соединённых переливным отверстием (1).

Среда растворения попадает в камеру А с восходящим потоком, затем переходит в камеру Б, где поток является нисходящим, и проходит через маленькое выходное отверстие (2), ведущее вверх к фильтрующему устройству. Перед выходным отверстием может быть установлено сито с острием (3), улавливающее крупные частицы.

- II. Средняя часть ячейки имеет полость для сбора липофильных наполнителей (4), которые плавают на поверхности среды растворения. Метал-

лическая сетка (5) служит грубым фильтром.

III. Фильтрующая часть снабжена фильтром (6) из бумаги, стекловолокна или целлюлозы.

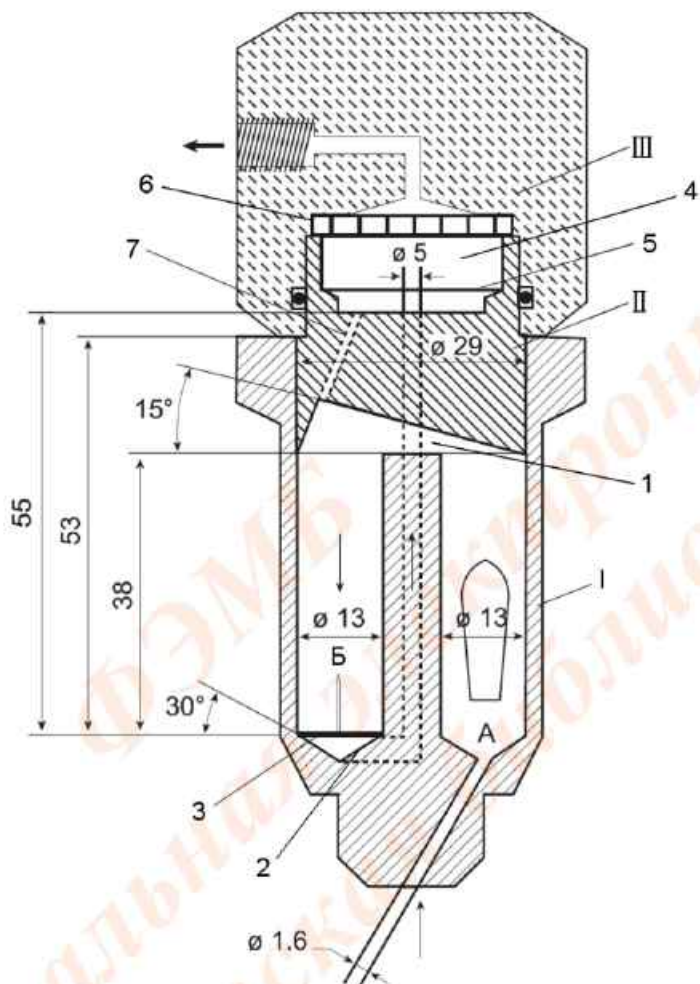


Рис. 2 – Проточная ячейка

Размеры указаны в мм

А – камера с восходящим потоком; Б – камера с нисходящим потоком;
1 – переливное отверстие; 2 – выходное отверстие; 3 – сито с остриём;
4 – полость для сбора липофильных наполнителей; 5 – металлическая сетка;
6 – фильтр; 7 – капилляр

Среда растворения

Если среда растворения содержит буферный раствор, то доводят значение pH до заданного (допустимое отклонение значения $\text{pH} \pm 0,05$). Перед использованием среда растворения должна быть деаэрирована.

Методика испытания

Одну дозированную единицу испытуемого лекарственного препарата помещают в камеру А. Закрывают ячейку подготовленной фильтрующей частью. Среду растворения нагревают до подходящей температуры. Используя насос, через нижнюю часть ячейки вводят подогретую среду растворения для создания потока в открытом или закрытом цикле с установленным отклонением скорости потока $\pm 5\%$. Когда среда растворения достигнет уровня переливного отверстия, воздух начнет выходить через капилляр (7), соединённый с фильтрующим устройством, и камера Б заполнится средой растворения. Действующее вещество распределяется в среде растворения в зависимости от его физико-химических свойств.

Отбор проб

Отбор проб производят на выходе из ячейки при использовании как открытого, так и закрытого цикла.

Отобранную пробу фильтруют с помощью инертного фильтра с соответствующим размером пор, не вызывающим адсорбции действующего вещества из раствора и не содержащим веществ, экстрагируемых средой растворения, которые могли бы влиять на результаты анализа, описанного в фармакопейной статье или нормативной документации метода.

Интерпретация результатов

Количество действующего вещества, перешедшего в раствор за указанное время, выражают в процентах от содержания, указанного на этикетке. За указанное в фармакопейной статье или нормативной документации время в среду растворения должно высвободиться не менее 75 % (Q) действующего вещества.

Испытание проводят на 6 единицах лекарственной формы. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, соответствует критериям, приведенным в таблице, стадия S_1 .

Если при этом хотя бы один результат не соответствует норме, указан-

ной в фармакопейной статье или нормативной документации, то испытание «Растворение» повторяют еще на 6 единицах лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно таблице, стадия S_2 .

Если при повторном испытании результаты не соответствуют установленным критериям, испытание повторяют на 12 дополнительных единицах лекарственной формы. Интерпретация результатов проводится согласно таблице, стадия S_3 .

При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации серия бракуется, если ни на одной из стадий исследования результаты испытания не удовлетворяют установленным критериям.

Таблица – Интерпретация результатов испытания «Растворение» для суппозиторий на липофильной основе

Стадия	Число испытываемых образцов	Одна единица лекарственной формы
S_1	6	Для каждой испытываемой единицы: в среду растворения должно высвободиться не менее $Q + 5\%$ от заявленного содержания действующего вещества
S_2	6	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 12 испытываемых единиц лекарственной формы ($S_1 + S_2$) должно быть не менее Q , и не должно быть ни одной единицы, где в среду растворения перешло бы менее $Q - 15\%$ от заявленного содержания действующего вещества
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытываемых единиц лекарственной формы ($S_1 + S_2 + S_3$) должно быть не менее Q ; только для 2 единиц может быть менее $Q - 15\%$, и ни для одной единицы не должно быть менее $Q - 25\%$ от заявленного содержания действующего вещества

Порошки (порошкообразные вещества), используемые в фармацевтической промышленности, – это лекарственные субстанции, вспомогательные вещества, а также их порошкообразные смеси и гранулы.

Широкое использование порошков в фармацевтической промышленности для создания самых различных лекарственных форм требует всесторонней оценки их технологических свойств, в основе которых лежит способность порошков течь (сыпаться) с определенной скоростью под воздействием силы тяжести.

Степень сыпучести – это комплексная технологическая характеристика, определяемая дисперсностью и формой частиц, остаточной влажностью и гранулометрическим составом порошкообразной системы.

Степень сыпучести порошков характеризуется следующими критериями:

- сыпучесть (скорость протекания порошка через отверстие);
- угол естественного откоса;
- насыпной объем.

На практике оценка степени сыпучести порошков определяется по одному, реже – 2 критериям. Наиболее распространенными испытаниями являются определение сыпучести (скорости протекания порошка через отверстие) и определение насыпного объема.

В зависимости от конкретных технологических задач (научно-исследовательская работа при создании нового препарата, воспроизводство препарата по описанной технологии и пр.) в практике технологии лекарств

венных форм существует несколько вариантов каждого из этих базовых определений. Кроме того, выполнение того или иного испытания на различных производствах может проводиться с использованием различного аппаратурного оформления.

Приведенные методики определения степени сыпучести ставят своей целью унифицировать по возможности условия проведения испытаний, однако, учитывая научно-исследовательский характер технологических операций при создании, например, новых препаратов, имеют рекомендательный характер.

Определение сыпучести

Сыпучесть определяется как время, в течение которого определенная масса вещества проходит (протекает) через отверстие определенного размера.

Оборудование. В зависимости от сыпучести испытуемых материалов используют воронки различных конструкций:

- без выходного ствола (типа «бункер», рис. 1), с различными размерами внутреннего угла и диаметрами выходных отверстий;
- с выходным стволом (рис. 2).

Воронка поддерживается в вертикальном положении при помощи специального устройства.

Вся конструкция должна быть защищена от вибраций.

Методика. В сухую воронку с закрытым выходным отверстием помещают без уплотнения навеску испытуемого материала, взятую с точностью $\pm 0,5$ %. Количество испытуемого материала зависит от его насыпного объема и от используемого оборудования, но должно занимать не менее 80-90 % от объема воронки.

Открывают выходное отверстие воронки и определяют время, за которое через отверстие пройдет весь образец. Проводят не менее 3 определений.

Если при использовании оборудования, представленного на рис. 1, скорость высыпания 100 г порошка через насадку 1 менее 25 с, рекомендуется использовать воронку, представленную на рис. 2.

Если при использовании оборудования, представленного на рис. 1, навеска испытуемого материала неравномерно высыпается из воронки с насадкой 1, последовательно определяют сыпучесть, используя воронку с насадкой 2 или 3.

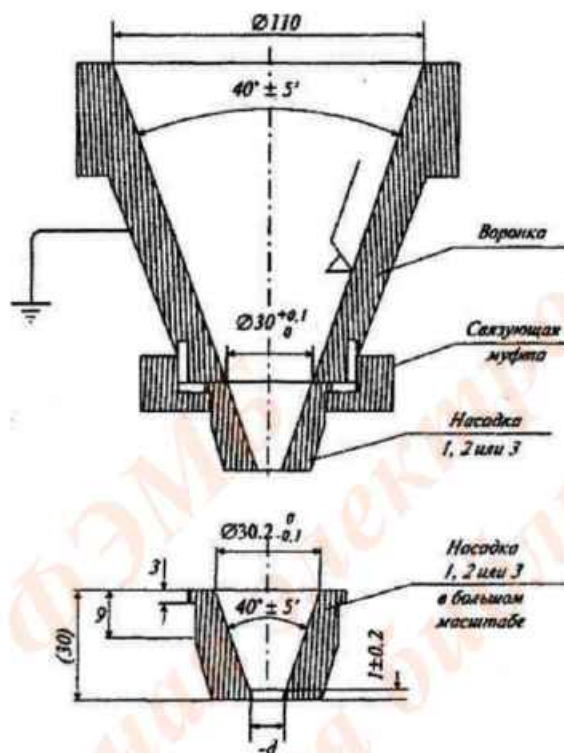


Рис. 1 – Воронка без выходного ствола (бункер) со сменной насадкой
Насадку изготавливают из нержавеющей кислотоупорной
стали (V4A, CrNi). Размеры указаны в мм

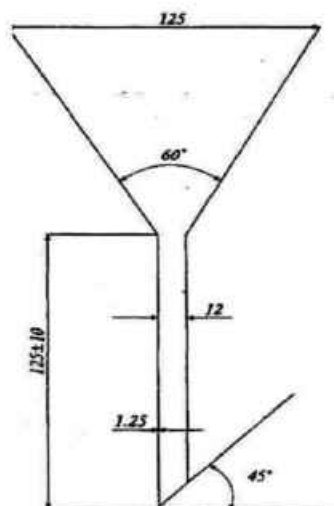


Рис. 2 – Воронка с выходным стволом
Размеры указаны в мм

В табл. 1 представлены типовые размеры диаметров выходных отверстий сменных насадок.

Таблица 1 – Типовые размеры диаметров выходных отверстий сменных насадок

Насадка	Диаметр (d) выходного отверстия, мм
1	$10 \pm 0,01$
2	$15 \pm 0,01$
3	$25 \pm 0,01$

Представление результатов. Сыпучесть выражают в секундах с точностью до 0,1 с, отнесенных к 100 г образца, с указанием типа использованного оборудования, номера насадки.

На результаты могут влиять условия хранения испытуемого материала.

Результаты могут быть представлены следующим образом:

а) как вычисленное среднее значение сыпучести при условии, что ни один из результатов не отклоняется от среднего значения более чем на 10 %;

б) в виде диапазона значений, если отдельные результаты отклоняются от среднего значения более чем на 10 %;

в) в виде графика зависимости массы испытуемого порошка от времени истечения.

Определение угла естественного откоса

Угол естественного откоса – это постоянный, трехмерный угол (относительно горизонтальной поверхности), сформированный конусообразной пирамидкой материала, полученной в определенных условиях эксперимента.

Методика. Определение угла откоса проводят по методике определения сыпучести с использованием того же оборудования в тех же условиях.

Истечение порошка из отверстия воронки производят на ровную горизонтальную поверхность. Диаметр основания (базы) конуса порошка может быть фиксированным или может меняться в процессе образования конуса.

Измерение значения угла естественного откоса проводят не менее чем в 3 повторностях при помощи угломера в 3 плоскостях и выражают в угловых градусах.

При проведении испытания следует учитывать, что:

- условия эксперимента должны обеспечивать формирование симметричного конуса порошка;
- вершина формирующегося конуса может деформироваться под воздействием падающих частиц порошка.

Эти внешние воздействия должны быть устранены любым приемлемым способом.

Кроме того, материал основы (базы), на которой формируется конус, может влиять на величину угла откоса.

В табл. 2 представлено примерное соотношение степени сыпучести порошков и угла естественного откоса, измеренного в условиях фиксированного диаметра основания конуса.

Таблица 2 – Степень сыпучести порошков и соответствующий угол естественного откоса

Степень сыпучести	Угол естественного откоса, градус
Очень хорошая	25 – 30
Хорошая	31 – 35
Удовлетворительная	36 – 45
Неудовлетворительная (требуется дополнитель-	46 – 55

Степень сыпучести	Угол естественного откоса, градус
ное перемешивание или вибрация)	
Плохая	56–65
Очень плохая	более 66

Представление результатов. Угол естественного откоса выражают в градусах, как вычисленное среднее значение, с указанием типа использованного оборудования, номера насадки, условий эксперимента (диаметр основания конуса, если он фиксированный, материала основы (базы), на которой формируется конус).

Определение насыпного объема

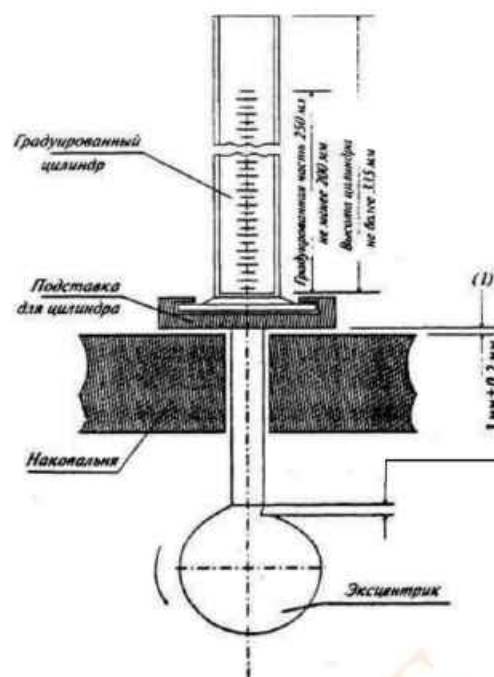
Испытание позволяет определить при заданных условиях насыпные объемы до и после уплотнения, способность к уплотнению, а также насыпную плотность отдельных материалов (например, порошков, гранул).

Оборудование. Прибор (рис. 3) состоит из следующих частей:

- встряхивающее устройство, обеспечивающее 250 ± 15 соскоков цилиндра в 1 мин с высоты $3 \pm 0,2$ мм;
- подставка для градуированного цилиндра, снабженная держателем, имеющая массу 450 ± 5 г;
- градуированный цилиндр вместимостью 250 мл (цена деления – 2 мл; масса цилиндра 220 ± 40 г).

Допускается использование других приборов подобного принципа действия.

Методика. В сухой цилиндр помещают без уплотнения навеску испытуемого материала, имеющего насыпной объем в диапазоне от 50 до 250 мл. Аккуратно закрепляют цилиндр на подставке и фиксируют насыпной объем до уплотнения (V_0) с точностью до ближайшего деления. Производят 10, 500 и 1250 соскоков цилиндра и фиксируют объемы V_{10} , V_{500} , V_{1250} с точностью до ближайшего деления. Если разность между V_{500} и V_{1250} превышает 2 мл, производят еще 1250 соскоков цилиндра.



Данный размер должен быть таким, чтобы зазор (I) удовлетворял требованиям спецификации и чтобы при этом в нижней точке эксцентрика подставка цилиндра свободно садилась на верхнюю наковальню

Рис. 3 – Прибор для определения насыпного объема

Представление результатов. По полученным результатам можно вычислить следующие параметры:

1. Насыпной объем:

- до уплотнения V_0 , мл;
- после уплотнения V_{1250} или V_{2500} , мл.

2. Способность порошка к уплотнению:

- разность объемов $(V_{10} - V_{500})$ мл.

3. Насыпная плотность:

- до уплотнения m/V_0 , г/мл;
- после уплотнения m/V_{1250} или m/V_{2500} , г/мл.

Полученные результаты можно использовать для вычисления коэффициента прессуемости по формуле:

$$\text{Коэффициент прессуемости} = 100 \cdot \left(\frac{V_0 - V_1}{V_0} \right)$$

где V_0 – начальный объем порошка;

V_1 – объем порошка после уплотнения.

Испытание предназначено для определения количества действующего вещества, которое высвобождается в среду растворения из трансдермального пластыря за определенный промежуток времени в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Растворение лекарственного вещества может происходить как в результате непосредственного его высвобождения из трансдермального пластыря в среду растворения (скорость высвобождения), так и в результате подачи лекарственного вещества в среду растворения через полимерную мембрану (скорость подачи).

В фармакопейной статье или нормативной документации указывают:

- тип прибора;
- описание держателя для трансдермального пластыря;
- площадь контакта трансдермального пластыря со средой растворения для определения скорости высвобождения действующего вещества или площадь контакта трансдермального пластыря с полимерной мембраной со средой растворения для определения скорости подачи действующего вещества;
- способ закрепления трансдермального пластыря;
- для прибора 1 – применяемая полимерная мембрана (при определении скорости подачи лекарственного вещества из трансдермального пластыря);
- состав и объем среды растворения;

- скорость вращения мешалки;
- время отбора проб;
- аналитический метод количественного определения действующего вещества или веществ, высвободившихся в среду растворения;
- нормативные требования.

Растворение (скорость высвобождения или скорость подачи) выражают количеством действующего вещества, высвободившегося в единицу времени с единицы площади трансдермального пластыря.

Оборудование

Используют аппарат II «Лопастная мешалка», описанный в ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм», который путём внесения дополнительных элементов может быть модифицирован в три самостоятельных прибора:

- прибор 1 – содержит держатель для трансдермального пластыря;
- прибор 2 – оснащён диском из нержавеющей стали для закрепления на его поверхности трансдермального пластыря;
- прибор 3 – взамен лопастной мешалки содержит цилиндр из нержавеющей стали.

Прибор выбирают в зависимости от состава, размеров и формы пластыря.

Прибор 1. На дно сосуда для растворения помещен держатель для трансдермального пластыря (рис. 1), выполненный из химически инертного материала. Держатель состоит из опорной части (основания), предназначенной для закрепления пластыря, и покровной части (крышечки) с центральным отверстием необходимого диаметра, подбираемого в соответствии с размером трансдермального пластыря. В конструкции держателя может применяться также полимерная мембрана, помещаемая между основанием и крышечкой. При определении скорости подачи лекарственного вещества в среду растворения из трансдермального пластыря через полимерную мем-

брану конструкция держателя не должна допускать контакт трансдермального пластыря со средой растворения.



Рис. 1 – Схема прибора 1

Полимерная мембрана применяется, когда непосредственный контакт поверхности трансдермального пластыря, высвобождающей действующее вещество, со средой растворения недопустим. Скорость диффузии лекарственного вещества в мембране должна быть постоянной во время проведения испытания и не должна оказывать влияния на кинетику процесса. Толщина мембраны должна обеспечивать ее механическую прочность и неизменность свойств во время проведения испытания.

Площадь высвобождающей поверхности держателя (площадь контакта трансдермального пластыря со средой растворения) должна быть от 5,0 до 25,0 см².

Держатель с закрепленным в нем трансдермальным пластырем (или трансдермальным пластырем с мембраной) помещают на дно сосуда высвобождающей поверхностью вверх параллельно нижнему краю лопасти мешалки. Объем среды растворения между держателем и дном сосуда должен быть минимальным, расстояние между поверхностью держателя и нижним краем лопасти мешалки должно составлять 25±2 мм и не меняться в течение испытания.

Прибор 2. В данном приборе используется сборный диск из нержавеющей стали в виде сетки с размером отверстий 125 мкм (рис. 2).

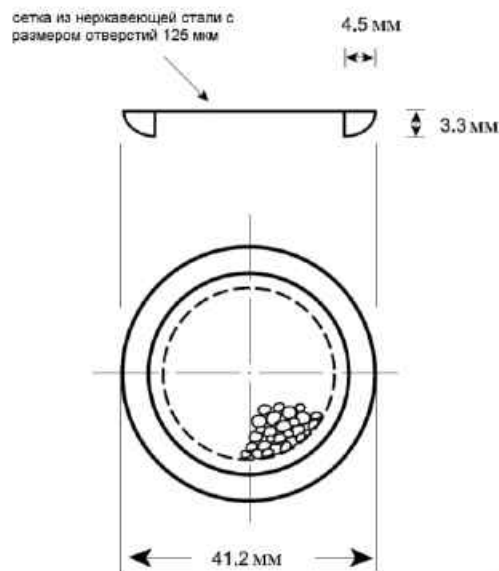


Рис. 2 – Схема сборного диска

Прибор 3. Мешалку и вал заменяют на вращающийся цилиндр из нержавеющей стали (рис. 3, 4). Расстояние между внутренней поверхностью сосуда и цилиндром должно быть 25 ± 2 мм и не меняться в течение испытания.

Среда растворения

В качестве среды растворения могут применяться вода, буферные растворы со значениями pH в интервале 5,5-7,5 (допустимое отклонение $\text{pH} \pm 0,05$), натрия хлорида раствор 0,9 %, органические растворители (спирт 96 %, изопропанол) и другие среды, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации. При отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, объем среды растворения обычно составляет 500 мл, а температура среды растворения в сосуде составляет $(32,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

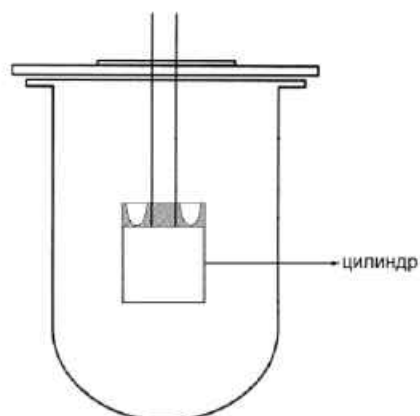


Рис. 3 – Схема прибора 3

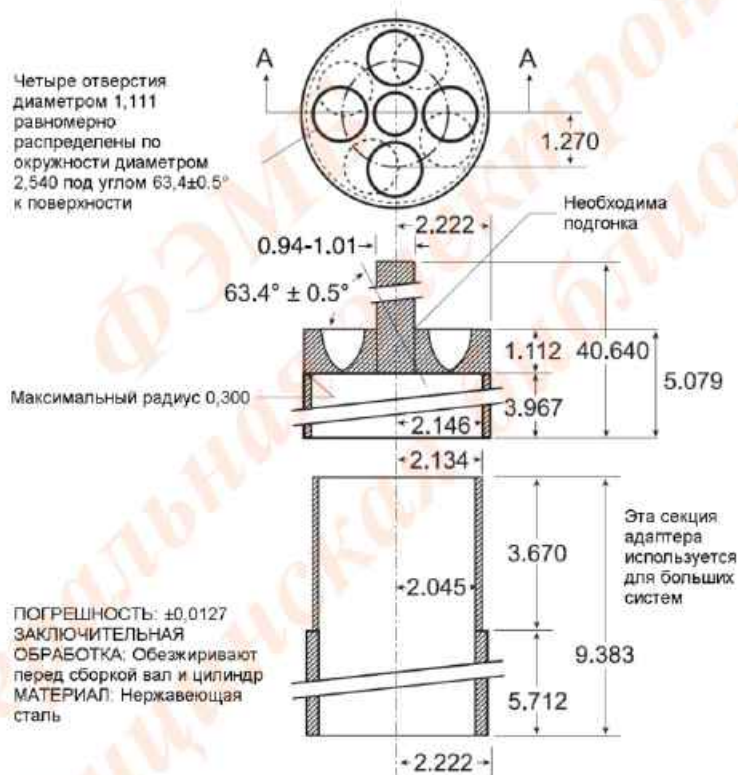


Рис. 4 – Схема вращающегося цилиндра
Размеры указаны в см

Растворенные газы, находящиеся в среде растворения, должны быть удалены до проведения испытания валидированным методом дегазации растворов.

Для предотвращения испарения среды растворения сосуда для растворения должны закрываться соответствующими крышками.

Скорость вращения мешалки

Скорость вращения мешалки составляет 100 об/мин при отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допустимое отклонение скорости вращения $\pm 4 \%$ от скорости, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика испытания

Испытание проводят не менее чем на 6 трансдермальных пластырях (или 5 в случае теста растворения с применением полимерной мембраны).

Объем среды растворения, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в сосуд и доводят температуру до $(32,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

При использовании прибора 1, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, на основание держателя помещают трансдермальный пластырь, при необходимости трансдермальный пластырь накрывают мембраной, затем помещают сверху крышку держателя, фиксируют её и опускают держатель в сосуд.

При использовании прибора 2 трансдермальный пластырь помещают на диск так, чтобы поверхность высвобождения пластыря была максимально плоской и ровной. Трансдермальный пластырь может крепиться к диску с помощью клея или двусторонней клейкой ленты. Трансдермальный пластырь не должен выходить за пределы диска. Диск с прикрепленным к нему трансдермальным пластырем помещают на дно сосуда.

При использовании прибора 3 с трансдермального пластыря удаляют защитную ленту и помещают его липкой стороной на чистую поверхность инертной пористой мембраны. Размер мембраны со всех сторон должен быть не менее чем на 1 см больше пластыря. Можно использовать два способа крепления трансдермального пластыря к цилиндру:

- трансдермальный пластырь с прикреплённой к нему мембраной помещают мембраной вниз на чистую поверхность и наносят подходящий клей на свободные края мембраны, а также при необходимости – на внешний по-

кровный слой пластыря;

- используют двустороннюю клейкую ленту, которую крепят к внешней стенке цилиндра.

Аккуратно надавливая, тщательно прикрепляют трансдермальный пластырь внешней покровной стороной к цилиндру так, чтобы продольная ось трансдермального пластыря находилась вокруг окружности цилиндра.

Для прибора 1, в случае использования мембраны, следует предварительно проверить влияние мембраны на результаты анализов. Для приборов 2 и 3 следует проверить влияние клея или клейкой ленты на результаты испытаний и исключить возможность адсорбции на них действующих веществ.

Включают перемешивающее устройство. С этого момента через каждый час или иной интервал времени, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, отбирают пробы раствора.

Отбор проб

Отбор проб осуществляют из средней по высоте части среды растворения на расстоянии не ближе 10 мм от внутренней стенки сосуда.

Каждую пробу анализируют на количественное содержание действующего вещества. Уменьшение объема среды растворения компенсируют либо возвращением пробы раствора в сосуд, либо добавлением среды растворения или учитывают при расчетах.

Время отбора проб должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации и должно соблюдаться с точностью $\pm 2\%$.

Интерпретация результатов

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, руководствуются данными табл. 1.

Результаты испытания считаются удовлетворительными, если скорость высвобождения (скорость подачи) соответствует критериям, приведенным в табл. 1, стадия А.

Если при этом хотя бы один результат не соответствует норме, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, то испытание

повторяют еще на 6 (5) образцах, при этом интерпретацию результатов проводят согласно табл. 1, стадия Б.

Если при повторном испытании результаты не соответствуют установленным критериям, испытание повторяют на 12 (10) дополнительных образцах, интерпретацию результатов проводят согласно таблице, стадия В. Если требование по стадии В не выполняется, то анализируемая серия бракуется.

Количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения в течение наибольшего из указанных в фармакопейной статье или нормативной документации периодов времени, должно составлять не менее 75 % от заявленного содержания действующего вещества в трансдермальном пластыре.

Таблица – Интерпретация результатов теста растворения для трансдермальных пластырей

Стадия	Число опытов	Критерии
А	6 (5)	Ни одно из индивидуальных значений скорости высвобождения (или подачи) действующего вещества из трансдермального пластыря не лежит вне нормируемых в фармакопейной статье или нормативной документации пределов значений скорости.
Б	6 (5)	Среднее значение индивидуальных значений скорости высвобождения (или подачи) действующего вещества из трансдермального пластыря в 12 (10) сосудах (А+Б) лежит в нормируемых в фармакопейной статье или нормативной документации пределах значений скорости. Ни одно из индивидуальных значений скорости высвобождения (или подачи) действующего вещества из трансдермального пластыря не отклоняется более чем на 10 % от среднего значения установленного предела от нормируемых в фармакопейной статье или нормативной документации пределов значений скорости.
В	12 (10)	Среднее значение индивидуальных значений скорости высвобождения (или подачи) лекарственного вещества из трансдермального пластыря в 24 (20) сосудах (А+Б+В) лежит в нормируемых в фармакопейной статье или нормативной документации пределах значений скорости.

Стадия	Число опытов	Критерии
		Не более чем 2 из 24 (20) результатов находятся вне нормируемых пределов значений, причем отклонение не превышает 10 % от среднего значения установленного предела, ни один из результатов не отклоняется от среднего нормируемого в фармакопейной статье или нормативной документации предела значений скорости более чем на 20 %.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Лекарственное растительное сырье
Фармацевтические субстанции
растительного происхождения**

ОФС.1.5.1.0001.15

Вводится впервые

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырье и фармацевтические субстанции растительного происхождения.

Основные термины и определения

Лекарственное растительное сырье – свежие или высушенные растения, либо их части, используемые для производства лекарственных средств организациями-производителями лекарственных средств или изготовления лекарственных средств аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность.

Фармацевтическая субстанция растительного происхождения – стандартизованное лекарственное растительное сырье, а также вещество/вещества растительного происхождения и/или их комбинации, продукты первичного и вторичного синтеза растений, в том числе, полученные из культуры растительных клеток, суммы биологически активных веществ растений, продукты, полученные путем экстракции, перегонки, ферментации или другим способом переработки лекарственного растительного сырья, и применяемые для профилактики и лечения заболеваний.

Лекарственный растительный препарат – лекарственный препарат, произведенный или изготовленный из одного вида лекарственного

растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемый в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке.

Лекарственное растительное сырье может быть представлено различными морфологическими группами: трава, листья, цветки, плоды, семена, кора, почки, корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы и другие.

По измельченности лекарственное растительное сырье может быть:

- цельное;
- измельченное;
- порошок.

Различают лекарственное растительное сырье по наличию основных групп биологически активных веществ, используемых для стандартизации лекарственного растительного сырья, например, сырье, содержащее флавоноиды, сердечные гликозиды, алкалоиды, антраценпроизводные, дубильные вещества и др.

По назначению лекарственное растительное сырье разделяют на сырье:

- используемое для производства лекарственных растительных препаратов (например, измельченные в пачках цветки, порошок в фильтр-пакетах);
- используемое для изготовления лекарственных растительных препаратов (например, настоев, отваров).

ПРОИЗВОДСТВО

Лекарственное растительное сырье и фармацевтические субстанции растительного происхождения получают от культивируемых или дикорастущих растений. Для обеспечения качества лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения необходимо соблюдать соответствующие правила культивирования, заготовки, сушки, измельчения и условий хранения. В лекарственном растительном сырье и фармацевтических субстанциях растительного происхождения допускается содержание посторонних

примесей, как органического (части других неядовитых растений), так и минерального (земля, песок, камешки) происхождения в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Лекарственное растительное сырье и фармацевтические субстанции растительного происхождения, используемые для производства и изготовления лекарственных средств, должны соответствовать требованиям соответствующих фармакопейных статей или нормативной документации.

Для проведения анализа с целью определения соответствия качества лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения и получаемых из них лекарственных растительных препаратов требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации установлены единые требования к отбору проб (в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»).

При изготовлении из лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения настоев и отваров определяется коэффициент водопоглощения и расходный коэффициент в соответствии с требованиями ОФС «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья».

ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА И МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Подлинность. Лекарственное растительное сырье идентифицируют по макроскопическим (внешним) и микроскопическим (анатомическим) признакам (в соответствии с требованиями ОФС на морфологическую группу сырья и ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»), а также определяют наличие в анализируемом

лекарственном растительном сырье основных групп биологически активных веществ, подтверждающих его подлинность (в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»). Для этого используют методы физико-химического, химического, гистохимического и микрохимического анализа.

Измельченность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Влажность. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зола общая. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая». Не распространяется на культуру растительных клеток.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте». Не распространяется на культуру растительных клеток.

Органическая и минеральная примесь. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Не распространяется на культуру растительных клеток.

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов». Данный показатель оценивается в процессе хранения лекарственного растительного сырья и при его поступлении в переработку.

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии технологического процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание биологически активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие лекарственного растительного сырья, определяют методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методики, используемые для количественного определения основных групп биологически активных веществ должны быть валидированы.

В зависимости от назначения лекарственного растительного сырья для одного и того же вида лекарственного растительного сырья могут быть приведены нормы содержания одной, двух и более групп биологически активных веществ.

Содержание экстрактивных веществ нормируется фармакопейной статьей или нормативной документацией на лекарственное растительное сырье в случае получения экстракционного препарата из этого вида лекарственного растительного сырья.

В лекарственном растительном сырье проводят количественное определение:

- экстрактивных веществ – в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;

– эфирного масла – в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;

– жирного масла – в соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные»;

– дубильных веществ – в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

– других групп биологически активных веществ в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

Содержание биологически активных веществ, относящихся к ядовитым и сильнодействующим веществам (сердечных гликозидов, алкалоидов и др.), указывают с обозначением двух пределов «не менее» и «не более». В случае завышенного содержания этих групп биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье допускается его дальнейшее использование для производства лекарственных препаратов, которое рассчитывается по формуле:

$$m = \frac{A \cdot B}{B}$$

где m – количество лекарственного растительного сырья, необходимое для производства лекарственных растительных препаратов, г;

A – прописанное количество лекарственного растительного сырья, г;

B – фактическое количество единиц действия в сырье или содержание биологически активных действующих веществ в 1 г сырья в %;

B – стандартное содержание единиц действия в сырье или содержание биологически активных действующих веществ в 1 г сырья в %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. Осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. Осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных

растительных препаратов». В случае использования дезинфицирующих, дезинсектирующих и других средств при хранении лекарственного растительного сырья, необходимо подтвердить, что они не оказывают влияния на сырье и практически полностью удаляются после обработки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Травы

ОФС.1.5.1.0002.15

Herbae

Взамен ГФ X, ст. 320,
ст. ГФ XI, вып. 1

Травами в фармацевтической практике называют лекарственное растительное сырье, представляющее собой высушенные или свежие надземные части травянистых растений. Траву собирают во время цветения, иногда во время бутонизации или плодоношения. Сырье состоит из стеблей с листьями, цветками, отчасти с бутонами и незрелыми плодами. У одних растений собирают только верхушки, у других – всю надземную часть, у третьих – надземную часть вместе с корнями.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Подготовка объекта к анализу: при необходимости сухую траву размачивают, погружая ее на несколько минут в горячую воду или помещая во влажную камеру. Если трава измельченная, то для размачивания выбирают куски стебля, листья, цветки, плоды. Свежую траву исследуют без предварительной обработки.

Подготовленную к анализу траву раскладывают на стеклянной пластинке, тщательно расправляя стебель, листья, цветки, плоды. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.).

При определении внешних признаков травы обращают внимание на строение стеблей, листьев (см. ОФС «Листья»), цветков (см. ОФС «Цветки»), при необходимости плодов (см. ОФС «Плоды»).

В строении стебля отмечают:

1. Характер ветвления (простой или ветвистый);

2. Форму поперечного сечения (цилиндрическая, ребристая, четырехгранная и т.д.);
3. Характер поверхности (гладкая, ребристая, бороздчатая и др.);
4. Опушение (обилие и расположение волосков);
5. Листорасположение (очередное, супротивное, мутовчатое);
6. Размеры (длину стебля и диаметр у основания) определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги.

Цвет сухого сырья определяют при дневном свете; запах – при растирании, вкус – пробуя сухое сырье или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Для измельченной травы приводится *измельченность* – размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц.

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется). При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на опушенность кусочков, характер поверхности (гладкая, шероховатая, покрытая железками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельной и измельченной траве), измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельное и измельченное сырье.* Готовят микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» из цельных листьев или кусочков пластинки листа с краем и жилкой, кусочков листа от основания и верхушки, кусочков черешка (если лист имеет черешок), чашечки или ее кусочков, венчика, кусочков цветоножки (при необходимости), кусочков стеблей (при необходимости); кусочков плодов (если есть и при необходимости, рассматривая их с поверхности).

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

1. Анатомо-диагностические признаки листьев (см. ОФС «Листья»).
Для цельной травы обычно бывает достаточно определить анатомо-диагностические признаки листьев. Для измельченной травы проводят анализ анатомо-диагностических признаков всех морфологических частей травы.

2. Анатомо-диагностические признаки цветков (см. ОФС «Цветки»).

3. Редко определяют анатомо-диагностические признаки плодов (см. ОФС «Плоды»).

4. Анатомо-диагностические признаки стебля.

В диагностических целях в стебле необходимо рассматривать:

1. *Характер кутикулы* (ровная, морщинистая, в том числе продольно-морщинистая, поперечно-морщинистая, лучисто-морщинистая; штриховатая, гребневидная и др.), *степень выраженности* изменения ровности кутикулы.

2. *Форму клеток эпидермиса* (изодиаметрическая – округлая, квадратная, многоугольная; полигональная – прямоугольная, овальная, ромбовидная, веретеновидная, комбинированная и др.).

3. *Извилистость стенок клеток эпидермиса* (прямые, извилистые, волнистые, зигзагообразные, зубчатые и др.), *степень извилистости*.

4. *Утолщенность стенок клеток эпидермиса* (наличие четковидной утолщенности).

5. *Наличие устьиц и их форма* (круглая, овальная), *размеры*.

6. *Тип устьичного аппарата* (см. ОФС «Листья»).

7. *Погруженность устьиц в эпидермис* (выступающие над эпидермисом, погруженные в эпидермис).

8. *Наличие, характеристика и размеры волосков* (простые и головчатые, одно- и многоклеточные, одно-, дву- и многорядные, пучковые, разветвленные и неразветвленные), *особенности их мест присоединения* (наличие розетки), *утолщенность стенок* (толстые, тонкие стенки),

характер кутикулы (ровная, бородавчатая, штриховатая).

9. Наличие и структура железок, их размеры.

10. Наличие секреторных каналов, млечников, вместилищ.

11. Наличие кристаллов, их структура (одиночные кристаллы различной формы, друзы, рафиды, стиллоиды, цистолиты, кристаллический песок и др.), локализация (в паренхиме под эпидермисом, в паренхиме в виде кристаллоносной обкладки вокруг проводящих пучков и групп волокон, редко в клетках эпидермиса), размеры.

12. Наличие включений: слизи, инулина, каротиноидов и др. (в паренхиме под эпидермисом, редко в клетках эпидермиса).

13. Наличие аэренхимы.

Рассмотрение поперечных срезов стеблей возможно в исключительных случаях (при возникновении спорных вопросов или других причин).

Примечание. Чаще встречаются стебли с клетками эпидермиса прямоугольной формы, с ровными стенками, и более редко, чем на листе, встречающимися устьицами. Остальные анатомо-диагностические признаки чаще всего совпадают с таковыми листа, но могут иметь иные размеры и частоту встречаемости.

Порошок. Готовят микропрепараты порошка травы в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В микропрепаратах порошка рассматривают фрагменты листьев (см. ОФС «Листья»), цветков (см. ОФС «Цветки») и плодов (см. ОФС «Плоды»), стеблей.

Среди фрагментов стебля будут иметь значение фрагменты эпидермиса, фрагменты более глубоких структур с млечниками, вместилищами, кристаллами и другими характерными анатомо-диагностическими признаками.

В порошке с размером частиц более 0,5 мм в рассматриваемых фрагментах можно различить практически все признаки, характерные для цельного и измельченного сырья. Некоторые элементы эпидермиса могут

встречаться в виде обломков волосков, железок; из-за разрушения клеток могут встречаться отдельные кристаллы, друзы и т.д.

В порошке лекарственного растительного сырья с размером частиц менее 0,5 мм анатомо-диагностические признаки, характерные для сырья, представлены отдельными волосками, железками, кристаллами, особенностями клеток и т.п.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок травы, реже поперечный срез листа, приготовленный из цельного или измельченного сырья после предварительного размягчения во влажной камере. Наблюдают собственную (первичную) флуоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее яркое свечение имеют кутикула, клеточные оболочки механических тканей, элементов ксилемы, волосков, содержимое отдельных клеток или тканей мезофилла, эпидермиса в зависимости от их химического состава. Листья некоторых растений характеризуются ярким и специфическим свечением содержимого железок, секреторных каналов и вместилищ в зависимости от химического состава содержимого. Яркая флуоресценция характерна для фрагментов проводящих пучков стебля (сосуды ксилемы и механические волокна); хорошо видна пыльца; фрагменты эндодермы семени обычно имеют яркое голубое свечение (жирное масло).

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят в микропрепаратах листьев (на поперечных срезах, срезах с поверхности, в порошке), чаще всего с целью обнаружения толстой кутикулы, эфирного масла (может быть представлено в виде капель или заключено во вместилища и/или каналы), а также слизей, в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из травы по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений травы с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из травы определяют компоненты эфирных масел, флавоноиды и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят в извлечении из травы при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В целом, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в фармакопейных статьях или нормативной документации;
- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных

растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки определяется для цельного, измельченного сырья и порошка в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота определяется для цельного, измельченного сырья и порошка. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) определяют различными химическими, физико-химическими или другими методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья

экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

Листья

ОФС.1.5.1.0003.15

Folia

**Взамен ГФ X, ст. 275,
ст. ГФ XI, вып. 1**

Листьями в фармацевтической практике называют лекарственное растительное сырье, представляющее собой высушенные или свежие листья или отдельные листочки сложного листа. Листья собирают обычно вполне развитые, с черешком или без черешка.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Подготовка объектов к анализу:

- мелкие и кожистые листья исследуют сухими;
- крупные, тонкие листья (как правило, смятые) размягчают во влажной камере или путем погружения на несколько минут в горячую воду;
- свежие листья исследуют без предварительной обработки.

Подготовленные к анализу листья раскладывают на стеклянной пластинке, тщательно расправляя, рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

1. *Строение* (простое, сложное – непарноперистосложное, парноперистосложное, дваждыпарноперистосложное, дваждынепарноперистосложное, пальчатосложное, тройчатосложное и др.) *и размеры листовой пластинки.*

2. *Форму листовой пластинки* (округлая, эллиптическая, широкоэллиптическая, узкоэллиптическая, продолговатая, яйцевидная, широкояйцевидная, узкояйцевидная, обратнаяйцевидная, округлообратно-яйцевидная, широкообратнояйцевидная, ланцетная, сердцевидная,

стреловидная, копьевидная, серповидная, игольчатая и др.).

3. *Глубину рассечения листовой пластинки* (пальчатолопастные, перистолопастные, тройчатолопастные, пальчатораздельные, перистораздельные, тройчатораздельные, пальчаторассеченные, перисторассеченные, тройчаторассеченные).

4. *Характер основания* (округлое, широкоокруглое, узкоокруглое, клиновидное, узкоклиновидное, ширококлиновидное, усеченное, выемчатое, сердцевидное и др.) *и верхушки* (острая, округлая, туповатая, выемчатая, оттянутая и др.) *листовой пластинки*.

5. *Характер края листа* (цельный, пильчатый, двоякопильчатый, зубчатый, городчатый, выемчатый).

6. *Наличие черешка, его размеры*.

7. *Характер поверхности черешка* (гладкая, ребристая, бороздчатая и др.).

8. *Наличие влагалища, прилистников* (свободные, сросшиеся), *характеристика, размеры*.

9. *Опушение листа и черешка* (обилие и расположение волосков).

10. *Жилкование листа* (у однодольных – параллельное, дуговидное; у двудольных – перистое, пальчатое; у папоротников и примитивных семенных растений (гингко) – дихотомическое).

11. *Наличие эфирномасличных железок и других образований* на поверхности листа или наличие вместилищ в мезофилле.

Размеры определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Измеряют длину и ширину пластинки листа, длину и диаметр черешка.

Цвет определяют с обеих сторон листа на сухом материале при дневном свете.

Запах определяют при растирании.

Вкус определяют, пробуя сухое сырье или водное извлечение листьев (только у неядовитых объектов).

Для измельченных листьев определяют *измельченность* – размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц.

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется). При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на опушенность фрагментов, характер поверхности (гладкая, шероховатая, покрытая железками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельным и измельченным листьям). Определяют измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельные и измельченные листья.* Готовят микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» из цельных листьев или кусочков пластинки листа с краем и жилкой, кусочков листа от основания и верхушки, кусочков черешка (если лист имеет черешок), рассматривая их с поверхности. При анализе толстых и кожистых листьев (эвкалипт, толокнянка, брусника) готовят поперечные срезы и «давленные» микропрепараты. При необходимости также готовят поперечные срезы черешков.

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

1. *Характер кутикулы* верхнего и нижнего эпидермиса (ровная; морщинистая, в том числе продольно-морщинистая, поперечно-морщинистая, лучисто-морщинистая; штриховатая; гребневидная и др.).

2. *Форма клеток* верхнего и нижнего эпидермиса (изодиаметрическая – округлая, квадратная, многоугольная; полигональная – прямоугольная, овальная, ромбовидная, веретеновидная, комбинированная и др.); *извилистость стенок клеток* верхнего и нижнего эпидермиса (прямые,

извилистые, волнистые, зигзагообразные, зубчатые и др.), *степень извилистости*; *утолщенность стенок клеток* верхнего и нижнего эпидермиса (равномерная, четковидная).

3. *Наличие устьиц*, их форма (круглая, овальная), размеры, частота встречаемости на верхнем и нижнем эпидермисе.

4. *Тип устьичного аппарата*:

- аномоцитный тип (беспорядочноклеточный) – аномоцитный (или ранункулоидный) — устьица окружены неопределенным числом клеток, не отличающихся по форме и размерам от остальных клеток эпидермиса;

- диацитный тип (двуклеточный) – устьица окружены двумя околоустьичными клетками, смежные стенки которых перпендикулярны устьичной щели;

- парацитный тип (параллельноклеточный) – с каждой стороны устьица, вдоль его продольной оси расположены по одной или более околоустьичных клеток;

- анизоцитный тип (неравноклеточный) – устьица окружены тремя околоустьичными клетками, из которых одна значительно меньше двух других;

- тетрацитный тип – устьице окружено 4 симметрично расположенными околоустьичными клетками: две клетки параллельны устьичной щели, а две другие примыкают к полюсам замыкающих клеток;

- гексацитный тип – устьице окружено 6 околоустьичными клетками: две пары расположены симметрично вдоль замыкающих клеток, а две клетки занимают полярные положения;

- энциклоцитный тип – побочные клетки образуют узкое кольцо вокруг замыкающих клеток;

- актиноцитный тип – характеризуется несколькими побочными клетками, радиально расходящимися от замыкающих клеток.

5. *Наличие водяных устьиц* (отличаются крупным размером и

расположены обычно на верхушке листа или зубчика, над гидатодой).

6. *Погруженность устьиц в эпидермис* (выступающие над эпидермисом, погруженные в эпидермис).

7. *Наличие и строение волосков* на верхнем и нижнем эпидермисе (простые и головчатые, одно- и многоклеточные, одно-, дву- и многорядные, пучковые, разветвленные и неразветвленные), *их размеры, особенности мест их присоединения* (наличие розетки), *утолщенность стенок* (толстые, тонкие стенки), *характер кутикулы* (ровная, бородавчатая, штриховатая).

8. *Наличие железок* на верхнем и нижнем эпидермисе, *их строение, размеры*.

9. *Наличие секреторных каналов, млечников, вместилищ* (в паренхиме под эпидермисом).

10. *Наличие и строение кристаллических включений* (одиночные кристаллы различной формы, друзы, рафиды, стилоиды, цистолиты, кристаллический песок и др.), *их локализация* (в паренхиме под эпидермисом, в паренхиме в виде кристаллоносной обкладки вокруг проводящих пучков и групп волокон, редко в клетках эпидермиса), *размеры*.

11. *Наличие включений запасных питательных веществ*: слизи, инулина и др. (в паренхиме под эпидермисом, реже в клетках эпидермиса).

12. *Структура мезофилла* (форма клеток, однородность, расположение, наличие аэренхимы).

13. *Строение листа* (дорсовентральный, изолатеральный).

14. *Строение проводящей системы листа* (форма главной жилки; количество, форма, расположение проводящих пучков в жилке; структура проводящих пучков – расположение флоэмы и ксилемы, наличие механических тканей).

15. *Наличие механической ткани* (колленхима, склеренхимные волокна, каменистые клетки, лубяные волокна и др.).

16. *Строение черешка*: на поперечном срезе черешка листа указывают его форму в средней, базальной и апикальной части (округлая,

треугольная, желобчатая, серповидная, слегка крыловидная, ширококрылатая), число и расположение *проводящих пучков*, наличие механической ткани (колленхимы, склеренхимы).

Порошок. Готовят микропрепараты порошка листьев в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В микропрепаратах порошка рассматривают фрагменты листьев с главной и второстепенными жилками, фрагменты листьев с краем листовой пластинки, фрагменты верхушки листа, фрагменты в поперечном сечении, фрагменты черешка. В изучаемых частицах порошка отмечают все проявляющиеся анатомо-диагностические признаки, перечисленные для цельных и измельченных листьев. Обращают внимание на то, что ряд элементов (волоски, железки, кристаллы, друзы и пр.) может быть отделен от частиц листа; в порошке наблюдается много фрагментов тканей и отдельных элементов: волоски и их фрагменты, железки, отдельные кристаллы оксалата кальция и фрагменты кристаллоносной обкладки, механические клетки – волокна, склереиды, фрагменты секреторных каналов, вместилищ, млечников и др.

В порошке с размером частиц свыше 0,5 мм в рассматриваемых фрагментах можно различить практически все признаки, характерные для цельного и измельченного сырья. Некоторые элементы эпидермиса могут быть в виде обломков волосков, железок и др.; из-за разрушения клеток могут встречаться отдельные кристаллы, друзы и др.

Еще более затруднено выделение анатомо-диагностических признаков в порошке лекарственного растительного сырья с размером частиц менее 0,5 мм. Здесь также могут быть фрагменты различных участков эпидермиса листа, однако по возможности больше внимания следует уделить единичным элементам: отдельным волоскам, железкам, кристаллам, особенностям клеток и пр.

В порошке лекарственного растительного сырья с размером частиц

менее 0,5 мм обращают внимание на особенности строения клеток и наличие единичных элементов эпидермиса и мезофилла листа – отдельных волосков, железок, их фрагментов, кристаллов и др.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок, реже поперечный срез листа, приготовленный из цельного или измельченного сырья после предварительного размягчения во влажной камере. Наблюдается собственная (первичная) флуоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее яркое свечение имеют кутикула, клеточные оболочки механических тканей, элементов ксилемы, волосков, содержимое отдельных клеток или тканей мезофилла, эпидермиса листа в зависимости от их химического состава. Листья некоторых растений характеризуются ярким и специфическим свечением содержимого железок, секреторных каналов и вместилищ в зависимости от химического состава содержимого.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят в микропрепаратах листьев (на поперечных срезах, препаратах с поверхности, в порошке), чаще всего с целью обнаружения толстой кутикулы, эфирного масла (может быть представлено в виде капель или заключено во вместилища и/или каналы), а также слизи в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из листьев по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из листьев определяют компоненты

эфирных масел, флавоноиды и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят в извлечении из листьев при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельном, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации;
- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки должна соответствовать требованиям ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного

растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Определение содержания действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими или другими валидованными методами анализа в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки

должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Цветки	ОФС.1.5.1.0004.15
Flores	Взамен ГФ X, ст. 269, ст. ГФ XI, вып. 1

Цветками в фармацевтической практике называют лекарственное растительное сырье, представляющее собой высушенные отдельные цветки (с цветоножками или без них) или соцветия, а также их части или свежие цветки. Цветки собирают обычно в начале цветения, некоторые – в фазу бутонизации (Alabastra).

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Определяют *тип соцветия* (корзинка, щиток, зонтик, кисть, метелка и др.). Отмечают *целостность соцветий*, присутствие отдельных бутонов и цветков (для корзинок отмечают особенности краевых и трубчатых цветков), присутствие плодов (зрелых, незрелых). Если сырье представлено одиночными цветками, а не соцветиями, анализ внешних признаков начинают с характеристики цветка.

После размачивания цветков в течение 1 мин в горячей воде рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.), *строение цветка (или соцветия)*. Цветок помещают на предметное стекло и под лупой разделяют его препаровальными иглами на отдельные части. Обращают внимание на следующие признаки:

1. *Строение околоцветника:* простой (чашечковидный, венчиковидный) или двойной.
2. *Строение чашечки и венчика* (правильные – актиноморфные или

неправильные – зигоморфные).

3. *Число и форму чашелистиков (или зубчиков чашечки).*
4. *Число и форму лепестков (или зубчиков венчика).*
5. *Число и строение тычинок.*
6. *Число пестиков.*
7. *Особенности строения завязи и цветоложа.*

Кроме того, необходимо обратить внимание на опушенность всех частей соцветия (цветка) и цветоножки, а также характер поверхности цветоножки (гладкая, ребристая, бороздчатая и др.) и размеры – диаметр цветка (соцветия), длину цветоножки.

Размер (диаметр) определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги на размоченном материале. Для измельченного сырья приводится измельченность – размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц.

Цвет определяют при дневном свете; запах – при растирании, вкус – пробуя сухое сырье или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется). При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на опушенность кусочков, характер поверхности (гладкая, шероховатая, покрытая железками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельным и измельченным цветкам), измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельное и измельченное сырье.* Готовят микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» из отдельных частей соцветия (цветки, листочки обертки корзинки) или частей цветка (лепестки,

чашелистики), рассматривая их с поверхности. При необходимости готовят и изучают микропрепараты цветоножек по методике приготовления и анализа микропрепаратов стеблей (см. ОФС «Трава»).

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки (лепестков, чашелистиков, листочков обертки, эпидермиса цветоножек):

1. *Характер кутикулы* верхнего и нижнего эпидермиса.
2. *Форма клеток* верхнего и нижнего эпидермиса.
3. *Извилистость стенок клеток* верхнего и нижнего эпидермиса.
4. *Утолщенность стенок клеток* верхнего и нижнего эпидермиса.
5. *Наличие устьиц*, их форма, размеры на верхнем и нижнем эпидермисе.
6. *Тип устьичного аппарата*; количество околоустьичных клеток.
7. *Погруженность устьиц* в эпидермис.
8. *Наличие и характеристика волосков* на верхнем и нижнем эпидермисе, их размеры, особенности мест их присоединения.
9. *Наличие и структура железок* на верхнем и нижнем эпидермисе, их размеры.
10. *Наличие секреторных каналов, млечников, вместилищ* (в паренхиме под эпидермисом).
11. *Наличие и структура кристаллов* (в паренхиме под эпидермисом, редко в клетках эпидермиса), их размеры.
12. *Наличие включений* – слизи, инулин, каротиноиды и др. (в паренхиме под эпидермисом, редко в клетках эпидермиса).

Мезофилл анализируемых элементов цветка обычно однороден, проводящая система чаще представлена спиральными трахеидами, механическая ткань отсутствует (диагностическое значение может иметь строение механических элементов листочков обертки).

Помимо перечисленного, изучают пыльцу по следующим признакам:

1. *Форма пыльцы*: округлая, овальная, округло-угловатая (округло-трехгранная, округло-четырегранная, округло-пятигранная, округло-

шестигранная, округло-многогранная, сочетание округло-угловатой формы), комбинация нескольких типов.

2. *Характер поверхности пыльцы* (гладкая, шиповатая, шероховатая).

3. *Характер апертур* (утонченных мест) *эскины* (бороздные пыльцевые зерна: трехбороздные, четырехбороздные, пятибороздные, шестибороздные; поровые пыльцевые зерна: трехпоровые, четырехпоровые).

4. *Размеры пыльцы*.

Порошок. Готовят микропрепараты порошка цветков в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

В микропрепаратах порошка по возможности рассматривают цельные или почти цельные лепестки, чашелистики, листочки обертки корзинки, а также их фрагменты. В изучаемых частицах порошка отмечают все проявляющиеся анатомо-диагностические признаки, перечисленные для цельных и измельченных цветков. Обращают внимание на то, что ряд признаков (волоски, железки, кристаллы, друзы и пр.) могут быть отделены от частиц цветка. Особое внимание обращают на структуру пыльцы.

В порошке с размером частиц более 0,5 мм в рассматриваемых фрагментах можно различить практически все анатомо-диагностические признаки, характерные для цельного и измельченного сырья. Некоторые элементы эпидермиса могут встречаться в виде обломком волосков, железок, из-за разрушения клеток могут встречаться отдельные кристаллы, друзы и др.

В порошке лекарственного растительного сырья с размером частиц менее 0,5 мм анатомо-диагностические признаки, характерные для сырья, представлены отдельными волосками, железками, кристаллами, пыльцевыми зернами, особенностями строения клеток и др.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок или отдельные части соцветия, цветка; наблюдают собственную (первичную) флуоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее характерное свечение имеют кутикула, различные трихомы (волоски, железки), механические элементы, пыльцевые зерна, включения клеток в зависимости от их химического состава.

Качественные микрохимические реакции проводят в микропрепаратах цветков чаще всего с целью обнаружения эфирного масла (может быть представлено в виде капель или заключено во вместилища и/или каналцы), а также слизи. Методики проведения испытаний описаны в ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из цветков по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из цветков определяют компоненты эфирных масел, флавоноиды и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из цветков при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельном, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в фармакопейных статьях или нормативной документации;

- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;

- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;

- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;

- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки должна соответствовать требованиям ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных

препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими или другими методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

Кора	ОФС.1.5.1.0005.15
Cortex	Взамен ГФ X, ст. 182, ст. ГФ XI, вып. 1

Корой в фармацевтической практике называют наружную часть стволов, ветвей и корней деревьев и кустарников, расположенную к периферии от камбия. Кору, как правило, заготавливают весной в период сокодвижения и высушивают.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Кору исследуют сухой, рассматривая ее невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и другие). Диагностическое значение имеют:

1. *Форма кусков коры* (трубчатая, желобоватая, плоская и др.).

2. *Особенности наружной и внутренней поверхности.* Наружная поверхность коры с бурой или серой пробкой, блестящая или матовая, гладкая или морщинистая (слегка морщинистая), с продольными или поперечными морщинками, иногда с трещинками. Кора ветвей и стволов имеет округлые или продолговатые, поперечно или продольно вытянутые чечевички, иногда на ней могут быть листовые лишайники (кустистые лишайники при заготовке должны удаляться). Внутренняя поверхность коры обычно более светлая, гладкая или ребристая с многочисленными или редкими продольными тонкими выдающимися ребрышками.

3. *Характер излома.* Поперечный излом может быть неровный: занозистый, волокнистый или зернистый.

4. *Размеры коры* – длину и толщину – определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Для измельченного сырья приводится измельченность – размер отверстий сита, через которое

проходит смесь частиц.

5. *Цвет* определяют с наружной и внутренней поверхности коры при дневном свете.

6. *Запах* определяют при соскобе внутренней поверхности на свежем изломе сухой коры и при увлажнении.

7. *Вкус* определяют, пробуя сухое сырье или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется). При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на характер поверхности (гладкая, шероховатая, покрытая морщинками, трещинками, чечевичками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельной и измельченной коре), измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельное и измельченное сырье.* Готовят поперечные и продольные срезы коры, «давленные» микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

1. *Форма клеток пробки, ее толщина, окраска* (обычно клетки имеют прямоугольную сплюснутую форму с прямыми стенками, расположены ровными рядами, возможны и другие варианты).
2. *Соотношение толщины первичной и вторичной коры.*
3. *Ширина сердцевинных лучей.*
4. *Наличие секреторных каналов, млечников, вместилищ.*

5. *Наличие включений:* клетки с эфирным маслом, клетки с флобафенами и др.

6. *Наличие и структура кристаллов, их размеры.* Одиночные кристаллы часто встречаются в отдельных клетках паренхимы или в клетках паренхимы, окружающих лубяные волокна, образуя кристаллоносную обкладку.

7. *Характер проводящей системы.*

8. *Наличие механической ткани* (важный анатомо-диагностический признак). Отмечают наличие колленхимы; расположение, строение лубяных волокон и каменистых клеток (других элементов механической ткани); механические элементы могут располагаться одиночно и группами, рассеянно и поясами. Стенки лубяных волокон и каменистых клеток обычно сильно утолщены и лигнифицированы.

Все указанные признаки обнаруживаются в цельной и измельченной коре (в поперечных, продольных срезах и давленных препаратах). В измельченной коре указанные признаки чаще видны в продольном сечении. Наибольшее диагностическое значение имеют строение и расположение механических элементов, различные включения (особенно кристаллы), млечники, секреторные каналы, вместилища. В микроскопии измельченной коры отмечают также особенности фрагментов пробки.

Крахмальные зерна, встречающиеся в коре, — мелкие и диагностического значения не имеют.

Порошок. Готовят микропрепараты порошка в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

В микропрепаратах порошка в изучаемых частицах отмечают все анатомо-диагностические признаки, перечисленные для цельной и измельченной коры. Важнейшими диагностическими признаками в порошке коры являются: механические элементы (лубяные волокна, каменистые

клетки), их расположение (одиночно или группами), включения оксалата кальция, млечники, вместилища, секреторные каналы. В микроскопии порошка отмечают также особенности фрагментов пробки, клетки которой обычно многоугольной формы (вид с поверхности). В клетках паренхимы могут быть крахмальные зерна, кристаллы оксалата кальция, иногда эфирное масло.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечные срезы коры или порошок (соскоб) в ультрафиолетовом свете. Ярким свечением обладают одревесневшие элементы (лубяные волокна, каменистые клетки); флуоресценция клеток паренхимы зависит от химического состава коры.

Качественные микрохимические реакции проводят на поперечных срезах коры или с порошком коры. При этом чаще всего проводят реакции на наличие действующих веществ, в некоторых случаях на сопутствующие вещества, в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят на сухом сырье, с соскобом, порошком или с извлечением из коры по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из коры при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий снятия спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельном, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, методы определения которых указаны в фармакопейных статьях или нормативной документации;

- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;

- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;

- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;

- измельченность и содержание примесей, в том числе содержание кусочков коры, покрытых кустистыми лишайниками, в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими или другими валидированными методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Наиболее часто в коре определяют дубильные вещества в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», если нет других указаний в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ в соответствии с ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы	ОФС.1.5.1.0006.15
Radices, rhizomata, bulbi, tubera, bulbotubera	Взамен ГФ X, ст. 570, ст. ГФ XI, вып. 1

В фармацевтической практике используют высушенные, реже свежие подземные органы многолетних растений, собранные чаще осенью или ранней весной, очищенные или отмытые от земли, освобожденные от отмерших частей, остатков стеблей и листьев. Крупные подземные органы перед сушкой разрезают на части (продольно или поперек).

Сырье может быть представлено корнями – radices, корневищами – rhizomata, корневищами и корнями – rhizomata et radices, корневищами с корнями – rhizomata cum radicibus, луковицами – bulbi, клубнями – tubera и клубнелуковицами – bulbotubera.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы исследуют сухими, рассматривая невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Для измельченных подземных органов рассматривают и характеризуют кусочки сырья.

Диагностическое значение имеют:

1. *Форма кусков корней, корневищ, луковиц, клубней, клубнелуковиц.* Корни цилиндрические, реже конические, простые или разветвленные. Корневища простые или разветвленные, многоглавые, цилиндрические или овальные, четковидные, внутри сплошные или полые, прямые, изогнутые или перекрученные и т. д. Луковицы и клубнелуковицы шаровидные, яйцевидные,

продолговатые, сплюснутые и т. п. Клубни шаровидные, овальные, иногда сплюснутые, веретеновидные и т.п.

2. Особенности наружной поверхности. Поверхность неочищенных подземных органов может быть ровной или (чаще) морщинистой. Для корней обычно характерна продольно-морщинистая поверхность, для корневищ – продольная и поперечная морщинистость часто с характерными по форме и окраске следами удаленных корней, отмерших листьев и стеблей. Клубни чаще всего имеют морщинистую поверхность. Луковицы имеют обычно несколько наружных сухих чешуй, под которыми располагаются более или менее утолщенные сочные чешуи, сидящие на укороченном стебле (донце). Клубнелуковицы имеют только наружные сухие чешуи.

3. Характер излома. Излом может быть ровный, зернистый, пористый, занозистый или волокнистый.

4. Расположение проводящих элементов рассматривают невооруженным глазом, под лупой или стереомикроскопом на изломе или поперечном разрезе крупных корней, корневищ и клубней. Корни могут иметь первичное и вторичное строение. При первичном строении в центре виден центральный осевой цилиндр, при вторичном строении в центре находится древесина. Корневища могут иметь пучковое или беспучковое строение. У корневищ однодольных растений проводящие пучки разбросаны без особого порядка в коре и в центральном цилиндре. У двудольных растений в центре широкая сердцевина, при пучковом строении проводящие пучки расположены в виде кольца ближе к сердцевине. Корневища беспучкового строения отличаются от корней наличием в центре сердцевины (у некоторых видов она разрушена – корневище полое). Клубни чаще всего имеют пучковое строение

5. Размер - длину, диаметр, толщину определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Диаметр и толщину измеряют в наиболее широком месте. Для измельченного сырья приводится измельченность – размер отверстий сита, через которое проходит смесь

частиц.

6. *Цвет* определяют с поверхности и на свежем изломе при дневном свете.

7. *Запах* определяют при разламывании или растирании кусочка анализируемого подземного органа.

8. *Вкус* определяют, пробуя сухое сырье или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется). При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на характер поверхности частиц покровной ткани (гладкая, шероховатая, покрытая морщинками, трещинками и др.), а также наличие сухих и сочных чешуй (если имеются). Определяют запах и вкус (аналогично цельным и измельченным подземным органам). Определяют измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельное и измельченное сырье.* Готовят поперечные и продольные срезы, «давленные» микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

Для корней определяют первичное или вторичное строение.

А. Для *первичного строения* корня обычно характеризуют:

1. *Покровную ткань – эпидерму или ризодерму* (стенки клеток обычно тонкие, иногда утолщены с внешней стороны, могут подвергаться одревеснению или пробковению).

2. *Широкую первичную кору.*

3. *Эндодерму* (у однодольных эндодерма имеет подковообразное утолщение стенок клеток – представлена одним рядом клеток с утолщенными внутренними и радиальными стенками).

4. *Проводящую систему – закрытый сосудисто-волокнистый радиальный пучок* в центре корня.

Б. Для **вторичного строения корня** обычно характеризуют:

1. *Покровную ткань – перидерму* (состоит из более или менее толстого слоя пробки, феллогена и феллодермы).

2. *Кору* – состоит из клеток паренхимы, проводящих элементов луба (флоэмы), нередко присутствуют механические элементы: лубяные волокна, каменные клетки.

3. *Камбий.*

4. *Древесину (беспучковое строение)* – лучистое (часто) и нелучистое строение.

Для **корневищ** определяют строение, характерное для однодольных (пучковое) или двудольных растений (пучковое или беспучковое).

А. Для **пучкового строения корневищ однодольных растений** обычно характеризуют:

1. *Покровную ткань – эпидермис* (стенки клеток могут подвергаться одревеснению или опробковению, часто эпидермис разрушен, при этом наружные слои паренхимы коры опробковевшие).

2. *Кору, эндодерму* (с подковообразным утолщением стенок клеток).

3. *Закрытые сосудисто-волокнистые пучки* (расположены беспорядочно в коре и центральном цилиндре (камбий отсутствует), коллатеральные, концентрические).

Б. Для **пучкового строения корневищ двудольных растений** обычно характеризуют:

1. *Покровную ткань – перидерма;*

2. *Открытые коллатеральные и биколлатеральные сосудисто-*

волокнистые пучки (расположены по кругу (имеется камбий)).

3. *Центральную часть* (широкая сердцевина, состоящая из паренхимных клеток).

В. Для *беспучкового строения корневищ двудольных растений* обычно характеризуют:

1. *Покровную ткань – перидерму* (состоит из более или менее толстого слоя пробки, феллогена и феллодермы).

2. *Кору* – состоит из паренхимных клеток.

3. *Камбий*.

4. *Центральную часть* (серцевина, состоящая из паренхимных клеток, у некоторых видов она частично разрушена).

Для *клубней и клубнелуковиц* характерными анатомо-диагностическими признаками являются:

1. *Паренхима* (преобладающая ткань) с запасным питательным веществом, в которой расположены проводящие пучки.

2. *Форма клеток пробки*, ее толщина, окраска (обычно клетки имеют прямоугольную сплюснутую форму с прямыми стенками, расположены ровными рядами, возможны и другие варианты), при первичном строении корня отмечают особенности строения эпидермы или ризодермы (наличие корневых волосков).

3. *Наличие эндодермы. Эндодерма* – самый внутренний слой коры, представленный основной тканью, образующей влагалище вокруг участка, занятого проводящими тканями, и характеризующейся присутствием пояса Каспари на антиклинальных стенках клеток; позже клетки могут иметь вторичные оболочки (подковообразное утолщение).

4. *Выраженность камбия* (может отсутствовать, быть плохо выраженным, выраженным участками и хорошо выраженным (указывают толщину)).

5. *Лучистость строения древесины* (указывают ширину сердцевинных лучей) или отсутствие сердцевинных лучей.

6. *Характер проводящей системы* (структура и тип проводящих пучков или беспучковое строение; тип утолщенности стенок сосудов и трахеид).

Анатомо-диагностические признаки, которые могут встречаться во всех подземных органах:

1. *Секреторные каналы, млечники, вместилища.*
2. *Кристаллы* (отмечают их структуру и размеры). Одиночные кристаллы часто встречаются в отдельных клетках паренхимы или в клетках паренхимы, окружающих лубяные волокна, образуя кристаллоносную обкладку.
3. *Включения* (клетки с эфирным маслом, клетки со слизью, клетки с жирным маслом и др.).
4. *Запасные питательные вещества: инулин, крахмал* (указывают размер, форму, структуру крахмальных зерен).
5. *Волоски и сосочковидные выросты*, (отмечают их размеры (обычно встречаются на поверхности корней первичного строения и корневищ).
6. *Аэренхима.*
7. *Механическая ткань* (расположение, строение, лубяных и древесинных волокон, каменистых клеток (указать размеры) и других элементов механической ткани).

Все указанные признаки могут быть обнаружены в цельных корнях, корневищах, луковицах, клубнях, клубнелуковицах (в поперечных, продольных срезах и давленных препаратах). В измельченных подземных органах наибольшее значение имеют механические и проводящие элементы (их структура, расположение) в рассматриваемых фрагментах тканей; различные включения (в том числе кристаллы) и запасные питательные вещества (крахмал, инулин); млечники, эфиромасличные вместилища, секреторные каналы (их фрагменты). В микроскопии измельченных подземных органов отмечают также особенности фрагментов пробки (эпидермы, ризодермы).

Порошок. Готовят микропрепараты порошка в соответствии с ОФС

«Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

В микропрепаратах порошка в изучаемых частицах отмечают наличие анатомо-диагностических признаков, перечисленных для цельных и измельченных корней, корневищ, луковиц, клубней, клубнелуковиц (в поперечных, продольных срезах и давленных препаратах). В порошке наибольшее значение имеют фрагменты покровных, механических и проводящих тканей (их структура, расположение); различные включения (в том числе кристаллы) и запасные питательные вещества (крахмал, инулин); фрагменты млечников, эфиромасличных вместилищ, секреторных каналов. Отмечают также особенности фрагментов пробки (эпibleмы, ризодермы).

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез (или распил), сухой порошок или соскоб подземных органов. Наблюдается собственная (первичная) флуоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее яркое свечение имеют одревесневшие элементы (сосуды, трахеиды, лубяные и древесные волокна; каменистые клетки), содержимое секреторных образований (вместилищ, каналов, млечников). Флуоресценция клеток паренхимы зависит от химического состава.

Качественные микрохимические реакции проводят на поперечных срезах или с порошком подземных органов чаще всего на наличие действующих веществ, запасных питательных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят на сухом сырье, с порошком или соскобом, но чаще с извлечением из подземных органов, в соответствии с методиками, указанными в фармакопейных статьях или нормативной

документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из подземных органов определяют антраценпроизводные, флавоноиды, дубильные вещества и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из подземных органов при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводят описание условий снятия спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельном, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в фармакопейных статьях или нормативной документации;
- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки. Определяют в соответствии с

требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими или другими валированными методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение

содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

Плоды	ОФС.1.5.1.0007.15
Fructus	Взамен ГФ X, ст. 287, ст. ГФ XI, вып. 1

Плодами в фармацевтической практике называют плоды различных морфологических типов, отдельные плодики, соплодия и их части. Плоды собирают зрелыми (иногда в фазу технической зрелости) и высушивают. Некоторые сочные плоды перерабатывают свежими.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Плоды исследуют сухими, рассматривая их невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и другие). Сочные плоды, изменившие во время сушки форму, рассматривают сначала в сухом виде, а затем после размачивания в горячей воде или кипячения в течение 5 – 10 мин.

Плод состоит из сухого (сухие плоды) или сочного (сочные плоды) околоплодника (перикарпия) и заключенных в него семян. Сухие плоды часто имеют внутри полости – гнезда, число гнезд может быть различным. Иногда плод (шиповник) образован разросшимся гипантием, охватывающим прикрепляющиеся к нему изнутри плодики. Плодики – морфологические отдельности, формирующие апокарпный плод. Диагностическое значение имеют (для измельченного сырья рассматривают кусочки плодов и характеризуют их) следующие признаки:

1. *Тип плода* (морфологический): монокарпии, формируются из монокарпного гинецея – однолистовка, боб, сочная однокостянка, сухая однокостянка; апокарпии, формируются из апокарпного гинецея – сухая многолистовка, сочная многолистовка, земляничина или фрага, сочная

многокостянка, многоорешек, цинародий; ценокарпии, формируются из ценокарпного гинецея – ягода, коробочки разного типа, стручок и стручочек, гесперидий или померанец, тыква, яблоко, ценобий, вислоплодник, ценокарпная многокостянка или пиренарий, калачик (карцерула); псевдомонокарпии, формируются из псевдомонокарпного гинецея – орех, желудь, семянка, зерновка, псевдомонокарпная костянка.

2. *Тип околоплодника – сухой (сухие плоды) или сочный (сочные плоды).*

3. *Наличие плодоножки, ее длина, цвет и характер поверхности.*

4. *Форма и особенности строения околоплодника для сочных плодов определяют после размягчения (яйцевидная, шаровидная, продолговатая, сплюснутая, со слабо выступающими продольными ребрами, с остатками чашечки и др.).*

5. *Характер поверхности околоплодника (шероховатая, морщинистая, гладкая, блестящая и др.).*

6. *Число гнезд в плоде (если они имеются).*

7. *Наличие эфирномасличных каналов илиместилиц.*

8. *Размеры (длина, толщина, поперечник плода) определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Для измельченных плодов приводят измельченность – размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц.*

9. *Количество семян, их форма, размеры, характер поверхности и т.д. определяют для сочных плодов после их размягчения и отделения семян от мякоти (см. ОФС «Семена»).*

10. *Наличие плодоножки, ее длина, цвет и характер поверхности (гладкая, ребристая, бороздчатая и др.).*

11. *Цвет околоплодника определяют при дневном освещении.*

12. *Запах определяют при разламывании или растирании.*

13. *Вкус определяют, пробуя сухое сырье или водное извлечение (только для неядовитых объектов).*

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется), наличие цельных или почти цельных семян. При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на опушенность фрагментов, характер поверхности (гладкая, шероховатая, покрытая железками, чечевичками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельным и измельченным плодам), измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. Цельные плоды. Микропрепараты готовят в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». С диагностической целью рассматривают препараты околоплодника (эпидермис, мезокарпий, эндокарпий), гипантия (если имеется) и семян. Готовят поперечные срезы и срезы с поверхности. При необходимости готовят «давленные» микропрепараты.

Диагностическое значение имеет строение околоплодника. В околоплоднике различают три слоя: наружный – экзокарпий, средний – мезокарпий, внутренний – эндокарпий. Эндокарпий у некоторых плодов срастается с семенной кожурой, иногда эндокарпий представлен механической тканью в виде клеток с четковидными утолщениями.

Выделяют следующие анатомо-диагностические признаки:

1. *Характеристика эпидермиса:* характер кутикулы (отложения на ней воска), форма клеток эпидермиса (гипантия, плода, семени); извилистость стенок клеток эпидермиса; характер утолщения стенок клеток эпидермиса.

2. *Характеристика устьиц:* наличие устьиц в эпидермисе и их форма, размеры; тип устьичного аппарата, количество околоустьичных клеток; погруженность устьиц в эпидермис; наличие чечевичек в эпидермисе.

3. *Наличие и характер трихом (волосков)*, их размеры, особенности мест их прикрепления.

4. *Секреторные каналы, млечники, вместилища.*

5. *Наличие и характер клеток-идиобластов* (клетки, содержащие слизи, каротиноиды, кристаллы оксалата кальция и др.), их размеры.

6. *Характер паренхимы мезокарпия* (форма и размер клеток, однородность, плотность расположения).

7. *Наличие аэренхимы.*

8. *Характер проводящей системы* (расположение и строение проводящих пучков).

9. *Запасные питательные вещества*, их размеры.

10. *Наличие механической ткани* (каменистые клетки, склеренхимные волокна).

11. *Анатомо-диагностические признаки семян* (см. ОФС «Семена»).

Измельченное сырье. Готовят давленные микропрепараты. При необходимости и возможности готовят поперечные срезы крупных кусочков плодов и срезы с поверхности. Выделяют анатомо-диагностические признаки, перечисленные для цельных плодов, обнаруживаемые на фрагментах эпидермиса, эндокарпия, мезокарпия и семян (см. ОФС «Семена»). Фрагменты эпидермиса чаще проявляют признаки цельного сырья. Во фрагментах мезокарпия и эндокарпия наблюдают форму клеток паренхимы, наличие клеток-идиобластов, различных эндогенных секреторных структур (или их фрагментов), наличие кристаллов, запасных веществ, механических и проводящих элементов и их фрагментов.

Порошок. В порошке плодов имеют диагностическое значение фрагменты эпидермиса, эндокарпия, мезокарпия и семян (см. ОФС «Семена»). Фрагменты эпидермиса чаще проявляют признаки цельного сырья (форма клеток, характер кутикулы, наличие устьиц и др.). Волоски могут быть частично или полностью обломаны и встречаться отдельно от фрагментов эпидермиса. Во фрагментах мезокарпия и эндокарпия

наблюдают форму клеток паренхимы, наличие идиобластов, различных эндогенных секреторных структур (или их фрагментов), наличие кристаллов, запасных веществ, механических и проводящих элементов и их фрагментов. Разные виды кристаллов, включая друзы, а также каменистые клетки и другие анатомо-диагностические признаки могут встречаться отдельно от частиц порошка.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез после увлажнения плода во влажной камере, реже – сухой порошок. Отмечают первичную (собственную) флуоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Наблюдают структуру околоплодника, где особенно ярко выделяются механические элементы, секреторные каналы и их содержимое, проводящие пучки. Ярко флуоресцирует эндосперм семени и ткани зародыша. Флуоресценция обусловлена химическим составом тканей и для каждого вида специфична.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят в микропрепаратах плодов на наличие жирного и эфирного масел, крахмала, на одревесневшие элементы и др. в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из плодов по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из плодов определяют компоненты эфирных масел, витамины, фенольные соединения и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из плодов при

наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводят описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельных, измельченных плодах и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации;

- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;

- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;

- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;

- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки определяется в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими или другими методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка,

маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте, отдельно от других групп сырья.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Семена	ОФС.1.5.1.0008.15
Semina	Взамен ГФ X, ст. 602, ст. ГФ XI, вып. 1

Семенами в фармацевтической практике называют цельные семена разного типа, части семенного ядра и отдельные семядоли. Семена собирают, как правило, зрелыми, освобождают от околоплодника, а при необходимости от семенной кожуры, и высушивают.

Внешние признаки. *Цельное и измельченное сырье.* Семена исследуют сухими или реже размягченными во влажной камере, рассматривая их невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Снаружи семена покрыты семенной кожурой (спермодермой). Под семенной кожурой располагается семенное ядро, состоящее из эндосперма или перисперма (питательных тканей), которые могут отсутствовать, и зародыша. Диагностическое значение имеют (для измельченного сырья рассматривают отдельные фрагменты семян и характеризуют их) следующие признаки:

1. *Форма семени* (сплюснутая, яйцевидная, эллиптическая, заостренная, шаровидная и др.).

2. *Размеры семени* (длина, толщина или ширина) определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги, шарообразных семян – просеиванием сквозь сито с круглыми отверстиями. Для измельченных семян приводят измельченность – размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц.

3. *Характер поверхности* (гладкая, шероховатая, блестящая, матовая, голая или опушенная, ребристая или ямчатая и др.).

4. *Особенности семенной кожуры* (деревянистая, плотная, твердая, хрупкая, однослойная, состоящая из двух слоев, многослойная и др.).

5. *Наличие и форма рубчика или семяшва* и т.д. При необходимости отмечают размеры и окраску рубчика.

6. *Наличие эндосперма или перисперма.*

7. *Характеристика зародыша* (форма – прямой, дугообразный, кольцевидный, спиральный, подковообразный и др., размеры, его расположение и др.).

8. *Цвет* определяют при дневном свете.

9. *Запах* определяют при разламывании или растирании.

10. *Вкус* определяют, пробуя сырье или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Порошок. Рассматривают невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). Отмечают цвет смеси частиц (общей массы и отдельных вкраплений), форму частиц, происхождение частиц и их характер (если определяется), наличие цельных или почти цельных семян. При рассмотрении под лупой или стереомикроскопом обращают внимание на опушенность фрагментов семян, характер их поверхности (гладкая, ямчатая, шероховатая, покрытая железками и др.). Определяют запах и вкус (аналогично цельным и измельченным семенам), измельченность (размер отверстий сита, через которое проходит смесь частиц).

Микроскопия. *Цельное сырье.* Микропрепараты готовят в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Для определения подлинности готовят поперечные срезы и срезы с поверхности. При необходимости готовят продольные срезы и «давленные» микропрепараты.

В диагностике семян важное значение имеет строение семенной кожуры, которая может состоять из нескольких слоев характерного строения,

включая эпидермис семени (наружный слой кожур). Для некоторых семян характерно наличие слизи в эпидермальных клетках кожур, для других – пигментного слоя. Для общей микроскопической картины учитывают величину и форму запасавшей питательной ткани – эндосперма или перисперма, форму и строение зародыша (все вместе перечисленные выше структуры составляют семенное ядро). Диагностическое значение имеют следующие признаки:

1. *Характер кутикулы* (отложения воска на ней).
2. *Форма клеток эпидермиса, извилистость и утолщенность их стенок.*
3. *Наличие устьиц, их форма, размеры.*
4. *Наличие и характеристика волосков, особенности прикрепления к эпидермису, строение и размеры.*
5. *Структура семенной кожур:*
 - однослойная;
 - двухслойная;
 - многослойная – включает одновременно или в разных сочетаниях и в разной последовательности различные слои: **механический (твердый)** (состоит из одного или нескольких рядов толстостенных склеренхимных плотно сомкнутых изодиаметрических клеток или палисадных (типа волокон), вытянутых параллельно или перпендикулярно поверхности семени), **пигментный** (клетки этого слоя содержат пигмент или стенки клеток пропитываются пигментом), **разбухающий** или **слизистый** (состоит из одного или нескольких рядов паренхимных клеток, которые благодаря особенностям своего химического состава могут впитывать большое количество воды и сильно разбухать), **паренхимный** (состоит из живых паренхимных тонкостенных клеток, которые могут содержать запасные питательные вещества, при созревании запасные питательные вещества истощаются, клетки спадаются, формируя **бесструктурный** слой, состоящий из деформированных сжатых элементов, утративший свой клеточный

характер) и др.

6. *Секреторные каналы, млечники, вместилища.*

7. *Запасные питательные вещества* (крахмал, жирное масло, белки и др.), *кристаллические включения* (их строение и размеры).

8. *Характер проводящей системы.*

9. *Наличие механической ткани* (каменистые клетки, волокна и т.д.).

10. *Наличие аэренхимы.*

11. *Характеристика зародыша* – семядолей, корешка, стебелька, почечки зародыша; *по форме*: прямой, дугообразный, кольцевидный, спиральный, подковообразный, наподобие плоской пружины и др.

12. *Характер и структура эндосперма или перисперма.* Эндосперм обычно состоит из плотно сложенных клеток без межклетников с оболочкой разной толщины, более-менее изодиаметрических многоугольной формы, содержащих запасные питательные вещества, кристаллы оксалата кальция, эфирное масло. Структура перисперма и эндосперма часто бывает похожа. Существуют семена, не содержащие эндосперм (перисперм), накапливающие запасные питательные вещества в семядолях зародыша.

Измельченное сырье. Готовят «давленные» микропрепараты в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» При необходимости и возможности готовят поперечные срезы крупных кусочков семян и срезы с поверхности. Выделяют анатомо-диагностические признаки, перечисленные для цельных семян, обнаруживаемые на фрагментах эпидермиса, кожуры и др. Фрагменты эпидермиса чаще проявляют признаки цельного сырья. Диагностическое значение имеет строение отдельных слоев семенной кожуры, особенно механического и пигментного. Рассматривая фрагменты кожуры семян отмечают их принадлежность к соответствующему слою. Нередко встречается сочетание двух-трех слоев семенной кожуры, что также является характерным признаком. Наблюдают наличие различных эндогенных

секреторных структур (или их фрагментов), наличие кристаллов, запасных питательных веществ, каменистых клеток, механических и проводящих элементов и их фрагментов, содержимое клеток эндосперма и зародыша (жирное масло, слизь, кристаллы и др.).

Порошок. В порошке семян имеют диагностическое значение фрагменты семенной кожуры, в которых можно установить последовательность расположения составляющих ее слоев и их структуру, характер эпидермиса, наличие кристаллов, механических и проводящих элементов, эндогенных секреторных структур; а также фрагменты эндосперма с жирным маслом, кристаллами, слизью, алейроновыми зернами, крахмалом и отдельные зерна крахмала, кристаллы, каменистые клетки, склеренхимные волокна, капли масла.

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез после размягчения семени во влажной камере. Наблюдают первичную (собственную) флуоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Четко выделяются отдельные слои семенной кожуры, ярко флуоресцируют одревесневшие ткани; флуоресценция эндосперма и зародыша зависит от химического состава содержимого клеток; жирное масло обуславливает яркую голубую флуоресценцию эндосперма и зародыша.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят в микропрепаратах семян на наличие жирного и эфирного масел, слизи, крахмала, одревесневших элементов и др. в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из семян по методикам, указанным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография. Проводят анализ извлечений с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов. Чаще всего хроматографически в извлечениях из семян определяют компоненты эфирных масел, витамины и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из семян при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и минимум(ы) поглощения.

В цельном, измельченном сырье и порошке определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации;
- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» и ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- измельченность и содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки должна соответствовать с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и

лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) определяют различными химическими, физико-химическими или другими методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». В сухом, защищенном от света месте, отдельно от других групп сырья.

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

Почки	ОФС.1.5.1.0009.15
Гетмае	Вводится впервые

Почками в фармацевтической практике называют лекарственное растительное сырье, представляющее собой цельные, собранные в соответствующий период вегетации и высушенные боковые (пазушные) и верхушечные (терминальные) почки.

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Почки рассматривают невооруженным глазом, а также с помощью лупы (10×) и стереомикроскопа (8×, 16×, 24× и др.). В процессе анализа обращают внимание на следующие признаки:

1. *Тип почки* (вегетативная, генеративная или вегетативно-генеративная).
2. *Форму почки* или её очертания (округлая, овальная, конусовидная, яйцевидная, клиновидная, шиловидная и др.).
3. *Степень сомкнутости кроющих чешуй* (плотно сомкнутые, рыхлые).
4. *Характеристику почечных чешуй* (форма, особенности строения).
5. *Форму поперечного сечения почки* (округлая, сплюснутая, гранистая и др.).
6. *Наличие, степень и характер опушения почки* (опушенная, голая).
7. *Характер поверхности почки* – гладкая, матовая, блестящая.
8. *Смолистость почки* (смолистая, несмолистая).
9. *Тип почкосложения* в медиальной части почки (створчатое, полуобъемлющее, объемлющее, черепитчатое).
10. *Тип листосложения* в медиальной части почки (сложенное,

складчатое, скомканное, трубчатое, завернутое, отвернутое, улиткообразное, закрученное).

11. *Особенности расположения почки на побеге* (одиночные, мутовками).

12. *Размер* – определяют с помощью линейки или миллиметровой бумаги. Измеряют длину и ширину почки в самой широкой её части.

13. *Цвет* – определяют при дневном свете, рассматривая почку на сухом белом материале.

14. *Запах* – определяют при растирании или разламывании почки.

15. *Вкус* – определяют, пробуя фрагмент почки или водное извлечение (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. *Цельное сырье.* Микропрепараты готовят в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» из цельных почек, рассматривая их с поверхности, на поперечных и продольных срезах. Поперечные срезы следует делать в средней, т.е. медиальной части почки, определяя место среза по длине почки. При необходимости выполняют поперечный срез в базальной части почки и/или продольно-радиальный срез.

Обращают внимание на следующие анатомо-диагностические признаки:

1. *Эпидермис примордиев и кроющих чешуй* (форма клеток, кутикулизация и др.).

2. *Характер опушения:* наличие и особенности трихом, топография локализации трихом (по жилкам, по краю, по всей поверхности).

3. *Мезофилл примордиев и кроющих чешуй* (структура мезофилла, пигментация, наличие включений и др.).

4. *Особенности проводящих тканей примордиев и кроющих чешуй:* наличие проводящих пучков, их тип, степень армированности пучков.

5. *Особенности выделительной системы примордиев и кроющих*

чешуй: наличие вместилищ, клеток идиобластов с включениями (друзы, монокристаллы и др.).

6. *Смолистость почек* (наличие смолистых веществ).

7. *Типы устьичных аппаратов*, их встречаемость на листовых поверхностях (примордии, чешуи) (см. ОФС «Листья»).

8. *Погруженность устьиц* в эпидермис (выступающие над поверхностью, погруженные в эпидермис).

Описание основных диагностических признаков должно сопровождаться иллюстративным материалом.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят в микропрепаратах почек (на поперечных и продольных срезах, на препаратах с поверхности кроющих чешуй) с целью обнаружения кутикулы, эфирного масла, слизей, смолистых веществ, лигнифицированных оболочек клеток в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Качественные реакции проводят с извлечением из почек по методикам, приведенным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Хроматография проводится с извлечениями из почек с помощью различных хроматографических методик с использованием стандартных образцов, приведенных в фармакопейных статьях или нормативной документации. Хроматографически в почках определяют действующие вещества: простые фенолы, флавоноиды, компоненты эфирного масла, сапонины и др.

Спектр (УФ-спектр). Анализ проводят с извлечением из почек при наличии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Допускается ссылка на раздел «Количественное определение». Приводится описание условий регистрации спектра с указанием длин волн, при которых должны наблюдаться максимум(ы) и

минимум(ы) поглощения.

Для цельного сырья определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность, методы определения которых указаны в фармакопейных статьях или нормативной документации;
- возможно определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»;
- влажность в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»;
- содержание золы общей в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая»; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в соответствии с требованиями ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»;
- содержание примесей в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Масса содержимого упаковки определяется для цельного сырья в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зараженность вредителями запасов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. Определение проводят в соответствии с ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» на стадии производственного процесса.

Микробиологическая чистота определяется в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение действующих веществ (индивидуальных веществ или суммы веществ в пересчете на индивидуальное) проводят различными химическими, физико-химическими и другими методами анализа, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Косвенным методом количественного определения является определение экстрактивных веществ, извлекаемых определенным для сырья экстрагентом, в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указание «Продукция прошла радиационный контроль».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных

препаратов».

Срок годности. Срок годности должен быть обоснован фактическими данными определения стабильности по всем показателям качества лекарственного растительного сырья, заложенного на хранение в каждом из видов упаковки.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Эфирные масла

ОФС.1.5.2.0001.15

**Взамен ГФ X, ст. 471,
ст. ГФ XI, вып. 1**

Эфирные масла – продукты растительного происхождения, являющиеся многокомпонентными смесями летучих душистых веществ и относящиеся к различным классам органических соединений.

В составе эфирных масел преобладающими компонентами в большинстве случаев являются терпены и их производные, которые, как правило, представлены монотерпеноидами и сесквитерпеноидами, относящимися к различным классам органических соединений (насыщенные и полиненасыщенные, ациклические, моноциклические, бициклические и трициклические, а также кислородсодержащие). Встречаются также ароматические и алифатические соединения нетерпенового строения (спирты, фенолы, кислоты, альдегиды, сложные эфиры, сульфиды и др.).

Эфирные масла получают обычно из высушенного или свежесобранного лекарственного растительного сырья дистилляцией с водой или водяным паром, прессованием, экстракцией органическими растворителями или другими способами выделения.

Название исходного лекарственного растительного сырья, способы его обработки (высушенное, свежесобранное, цельное, измельченное), а также наименование производящего растения на русском и латинском языках (род, вид, семейство, от которого оно получено), должны указываться в фармакопейных статьях или нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Эфирные масла стандартизируют по следующим показателям качества:

«Описание»; «Подлинность»; «Растворимость»; «Спирт этиловый»; «Жирные и минеральные масла», в том числе осмолившиеся вещества; «Вода»; «Температура затвердевания»; «Плотность»; «Оптическое вращение»; «Показатель преломления»; «Кислотное число»; «Объем содержимого упаковки»; «Микробиологическая чистота»; «Количественное определение».

В случае необходимости дополнительно проводят испытания по следующим показателям: «Растворимость в спирте»; «Остаток эфирного масла после выпаривания»; «Переокисное число».

Описание. Бесцветные или окрашенные прозрачные подвижные жидкости, чаще желтоватого цвета, с характерным запахом. Как правило, эфирные масла легче воды.

Под влиянием воздуха и света многие эфирные масла, постепенно окисляясь, изменяют запах и цвет (темнеют). Некоторые эфирные масла при хранении загустевают.

Определение органолептических характеристик испытуемого эфирного масла проводят в сравнении со стандартным образцом.

Цвет и прозрачность определяют, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного бесцветного стекла диаметром 2 – 3 см, наблюдая перпендикулярно оси цилиндра в проходящем рассеянном дневном свете. Цветность может быть регламентирована в сравнении со стандартной шкалой цветности в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей», если есть указание в фармакопейной статье или нормативной документации.

Запах определяют, нанося около 0,1 мл (2 капли) эфирного масла на полоску фильтровальной бумаги длиной 12 см и шириной 5 см так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и оценивают запах через каждые 15 мин. В течение 1 ч запах испытуемого образца должен быть одинаков с запахом стандартного образца, нанесенного аналогичным образом на фильтровальную бумагу.

Подлинность. Определение проводят методом газовой хроматографии

в соответствии с требованиями ОФС «Газовая хроматография». Условия проведения анализа должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Для установления подлинности эфирных масел используют либо относительные времена удерживания отдельных, прежде всего преобладающих и специфичных компонентов, либо проводят сравнение хроматограммы испытуемого масла с хроматограммой стандартного образца масла, которая приводится в фармакопейной статье или нормативной документации.

С учетом лабильности многих соединений, являющихся компонентами эфирных масел, целесообразно использовать стеклянные колонки, предварительно проверенные на инертность. Проверку инертности колонок следует проводить следующим образом: на колонке при 130 °С хроматографируют стандартный образец линолилацетата. На хроматограмме должны отсутствовать дополнительные пики, свидетельствующие о разложении данного вещества.

Определение подлинности можно осуществлять также методом тонкослойной хроматографии и, при необходимости, другими фармакопейными методами.

Растворимость. Масла эфирные мало растворимы, очень мало растворимы или практически нерастворимы в воде; легко растворимы или растворимы в спирте различной концентрации, эфире и других органических растворителях.

Для определения растворимости эфирного масла в спирте этиловом 1 мл эфирного масла помещают в пробирку или цилиндр вместимостью 25 – 30 мл с притертой пробкой. Термостатируют образец при (20 ± 2) °С и все дальнейшее определение проводят при той же температуре окружающей среды. В бюретку вместимостью 25 мл помещают спирт этиловый, процентная концентрация которого должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации на конкретное эфирное масло. До момента полного растворения масла спирт прибавляют порциями по 0,1 мл

при частом интенсивном перемешивании. Регистрируют объем спирта, израсходованного для получения прозрачного раствора. Затем продолжают прибавлять спирт порциями по 0,5 мл при интенсивном перемешивании до тех пор, пока общий объем добавленного спирта не будет равным 20 мл. Если раствор становится мутным или опалесцирующим прежде, чем были добавлены 20 мл спирта, то регистрируют объем спирта в точке, в которой мутность или опалесценция появляется, а также тот объем, при котором мутность или опалесценция исчезает.

Если прозрачный раствор не образуется после добавления 20 мл спирта указанной концентрации, то испытание повторяют с использованием спирта более высокой концентрации.

В тех случаях, когда указано, что эфирное масло должно быть «растворимо в n или более объемах спирта указанной концентрации», то это означает, что прозрачный в n объемах спирта раствор остается прозрачным по сравнению с неразбавленным эфирным маслом после дальнейшего добавления спирта той же концентрации до общего объема, равного 20 мл спирта.

В тех случаях, когда указано, что эфирное масло должно быть «растворимо в n объемах спирта указанной концентрации с образованием мутного раствора при разбавлении», то это означает, что прозрачный в n объемах спирта раствор становится мутным в n_1 объемах спирта (когда n_1 менее 20) и остается таким после дальнейшего постепенного добавления спирта той же концентрации до общего объема, равного 20 мл спирта.

В тех случаях, когда указано, что эфирное масло должно быть «растворимо в n объемах спирта указанной концентрации с образованием мутного раствора между n_1 и n_2 объемами», то это означает, что прозрачный в n объемах спирта раствор становится мутным в n_1 объемах (когда n_1 менее 20) и остается таким после дальнейшего постепенного добавления спирта той же концентрации до общего объема спирта, равного n_2 (когда n_2 менее 20) и затем становится прозрачным.

Если указано, что эфирное масло должно быть «растворимо с опалесценцией», то это означает, что спиртовой раствор эфирного масла имеет опалесценцию, сравнимую с опалесценцией свежеприготовленного стандартного раствора мутности, полученного в тех же условиях следующим образом: смешивают 0,5 мл серебра нитрата раствора 1,7 % и 0,05 мл азотной кислоты концентрированной, прибавляют 50 мл натрия хлорида раствора 0,0012 %, перемешивают и выдерживают в течение 5 мин в защищенном от света месте.

Спирт этиловый. 1) 2 капли эфирного масла наносят на воду, налитую на часовое стекло, и наблюдают на черном фоне; не должно быть заметного помутнения вокруг капель масла.

2) 1 мл масла наливают в пробирку, закрывают ее рыхлым кусочком ваты, в середину которого помещен кристаллик фуксина основного, и подогревают до кипения на водяной бане; не должно быть фиолетово-розового окрашивания ваты.

Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества. 1) 1 мл эфирного масла взбалтывают в пробирке вместимостью 20 мл с 10 мл спирта 96 %; не должно наблюдаться помутнения и образования маслянистых капель.

2) 0,05 мл испытуемого эфирного масла помещают на фильтровальную бумагу. Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.

Остаток эфирного масла после выпаривания. Около 5 г (точная навеска) эфирного масла помещают в предварительно взвешенную выпарительную чашку диаметром 7 – 9 см. Если масло может иметь нелетучий остаток свыше 8 %, то в фармакопейной статье или нормативной документации может быть указана меньшая навеска масла для анализа. Чашку нагревают на кипящей водяной бане при выключенной вентиляции в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. Охлаждают в эксикаторе над кальция хлоридом безводным и

взвешивают.

Во время всего испытания следят за тем, чтобы уровень воды в бане находился на 15 – 20 мм ниже дна выпарительной чашки.

Содержание остатка эфирного масла после выпаривания (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{m},$$

где m_1 – масса чашки с остатком после выпаривания, г;

m_0 – масса пустой чашки, г;

m – навеска испытуемого масла, г.

Величина остатка эфирного масла после выпаривания должна соответствовать пределам, указанным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Вода. 0,5 мл эфирного масла смешивают с 10 мл петролейного эфира (4). Не должно наблюдаться помутнения.

Для эфирного масла, получаемого экстракцией сырья органическими растворителями, в фармакопейные статьи или нормативную документацию должны быть введены методики контроля органических растворителей и установлены нормы их остаточного содержания. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Температура затвердевания. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Температура затвердевания», при этом высота слоя эфирного масла в капилляре должна быть не менее 5 см. Значение температуры затвердевания должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Плотность». Значение плотности должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Оптическое вращение. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Поляриметрия». Значение величины оптического вращения должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или

нормативной документации.

Показатель преломления. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Рефрактометрия». Значение показателя преломления должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Кислотное число. Количество миллиграммов калия гидроксида, которое необходимо для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г эфирного масла, определяют в 1,5 – 2 г (точная навеска) масла, растворенных в 5 мл спирта, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину. Значение кислотного числа должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Перекисное число. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Перекисное число». Значение перекисного числа должно соответствовать пределам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Объем содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. В фармакопейную статью или нормативную документацию должен быть включен метод ГЖХ или иной для количественного определения преобладающих и/или специфичных компонентов эфирного масла и установлены нормы их содержания.

Процентные соотношения основных компонентов относительно друг друга устанавливают методом нормализации.

УПАКОВКА

Эфирные масла упаковывают в заполненные доверху стеклянные или металлические контейнеры. Особенности упаковки конкретных эфирных масел должны быть указаны в фармакопейных статьях или нормативной

документации.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». Хранят эфирные масла в защищенном от света месте при температуре от 8 до 25 °С.

СРОК ГОДНОСТИ

В соответствии с требованиями ОФС «Сроки годности лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности, в защищенном от света месте при температуре от 8 до 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Масла жирные растительные – это природные смеси, состоящие из триацилглицеридов (сложных эфиров глицерина с различными, как правило, высшими жирными кислотами).

При комнатной температуре растительные жирные масла имеют жидкую (персиковое, миндальное, подсолнечное масло) или твердую (плотную) консистенцию (масло какао).

В состав жидких жирных масел могут входить ненасыщенные жирные кислоты, содержащие 1, 2, 3 или 4 и более двойных связей. Как правило, чем больше непредельных кислот входит в состав триацилглицеридов жирного масла, тем выше его склонность к высыханию. В зависимости от состава триглицеридов и химической структуры высших жирных кислот жирные масла подразделяются на:

- невысыхающие, в триглицеридах которых преобладает олеиновая кислота (оливковое, персиковое, миндальное масло);
- полувысыхающие, в триглицеридах которых преобладает линолевая кислота (подсолнечное масло);
- высыхающие, в триглицеридах которых преобладает линоленовая кислота (льняное масло).

В состав триглицеридов твердых жирных растительных масел входят насыщенные кислоты (лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, арахидовая и др.).

Масла жирные, не обладающие выраженной фармакологической

активностью, используют в качестве вспомогательных веществ (персиковое, миндальное, подсолнечное, льняное масло).

В состав жирных масел могут входить различные биологически активные вещества в виде жирных кислот семейств омега-3 или омега-6; каротиноиды; токоферолы; стерины; лигнаны или другие соединения, которые обуславливают соответствующее фармакологическое действие жирного масла (слабительное, гепатопротекторное, антисклеротическое, ранозаживляющее и т.д.).

Название исходного лекарственного растительного сырья, способы его обработки (высушенное, свежесобранное, цельное, измельченное), а также наименование производящего растения на русском и латинском языках (род, вид, семейство, от которого оно получено), должны указываться в фармакопейных статьях или нормативной документации.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Масла жирные растительного происхождения, как правило, получают из плодов и семян растений методом холодного или горячего прессования. Затем отжатое (сырое) масло при необходимости очищают (рафинируют). Очистка проводится с целью удаления посторонних примесей и может включать такие стадии, как фильтрация, гидратация, щелочная очистка, дезодорация и другие.

При необходимости в жирные масла может быть добавлен соответствующий антиоксидант.

В производстве лекарственных форм для парентерального применения должны использоваться только невысыхающие жирные масла, получаемые методом холодного прессования и подвергнутые дополнительной очистке.

В фармакопейной статье или нормативной документации на жирное масло конкретного наименования должен быть указан источник получения – наименование исходного лекарственного растительного сырья на русском и латинском языках с указанием рода, вида и семейства, способа получения,

очистки или модификации жирного масла, названия введенных экзогенных антиоксидантов.

ИСПЫТАНИЯ

Жирные масла оценивают по следующим показателям качества: «Описание»; «Подлинность»; «Растворимость»; «Плотность»; «Температура затвердевания» и/или «Температура плавления»; «Показатель преломления»; «рН» и/или «Кислотное число»; «Число омыления»; «Йодное число»; «Перекисное число» и/или «Индекс окисленности», и/или «Анизидиновое число»; «Неомыляемые вещества»; «Летучие вещества»; «Тяжелые металлы»; «Мыла»; «Объем содержимого упаковки» или «Извлекаемый объем»; «Микробиологическая чистота» или «Стерильность», «Количественное определение».

Определение подлинности и количественное определение жирных масел, обладающих фармакологическим действием, проводят по биологически активным веществам масла, обуславливающим его фармакологическую активность.

Испытания на посторонние примеси, такие как «Тяжелые металлы» и «Мыла», являются обязательными для всех жирных масел. Испытания на наличие фосфорсодержащих и экзогенных веществ проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на масло жирное растительное конкретного наименования. Показатель качества «Гидроксильное число» применим только к маслам типа касторового, содержащего в составе триацилглицеридов остатки гидроксикислот.

Описание. Прозрачные, бесцветные или более или менее окрашенные маслянистые, подвижные или малоподвижные жидкости или твердые вещества без запаха или со специфическим характерным запахом.

Как правило, твердые масла имеют белый или желтовато-белый цвет, жидкие масла чаще всего окрашены в желтый, зеленый, оранжевый и другие цвета.

Жирные растительные масла, предназначенные для парентерального

применения, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, должны быть прозрачными при температуре до 10 °С, не должны иметь запаха (или быть почти без запаха).

Растворимость. Практически не растворимы в воде, мало растворимы в спирте, легко – в хлороформе, петролейном эфире, гексане, хлористом метиле, четыреххлористом углероде, в уксусной кислоте ледяной. Исключение составляет касторовое масло, легко растворимое в спирте, трудно – в петролейном эфире.

Подлинность. Для установления подлинности жирных масел используют качественные реакции, а также современные физические, химические и физико-химические методы: хроматографию в тонком слое сорбента, высокоэффективную тонкослойную хроматографию, газовую хроматографию, спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях, спектрометрию в инфракрасной области и др.

При наличии в жирных маслах экзогенных антиоксидантов установление их подлинности проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Плотность. Определяют с помощью пикнометра в соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Температура плавления и/или Температура затвердевания. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Температура плавления» и ОФС «Температура затвердевания».

Показатель преломления. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

рН. рН водной вытяжки жирного масла должен быть от 5,8 до 7,0. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Навеску масла массой от 2,0 до 5,0 г (конкретная величина навески должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации) встряхивают в течение 10 мин с 25 мл воды.

Кислотное число, гидроксильное число, число омыления, йодное

число, перекисное число, анизидиновое число. Определение указанных показателей проводят в соответствии с требованиями соответствующих общих фармакопейных статей.

Кислотное число не должно превышать 5,0. Кислотное число жирных масел, предназначенных для приготовления парентеральных лекарственных средств, должно быть не более 0,56.

Жирные растительные масла, предназначенные для приготовления парентеральных лекарственных средств, должны иметь число омыления от 185 до 200.

Йодное число жирных растительных масел, предназначенных для приготовления парентеральных лекарственных средств, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, должно быть от 79 до 141.

Перекисное число не должно превышать 10,0. Определение данного показателя проводят в первую очередь после отбора пробы от серии испытуемого масла.

Испытание по показателю «**Число омыления**» проводят из навески 2,0 г (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Индекс окисленности. Значение величины индекса окисленности жирного масла не должно превышать величины, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Около 0,04 г (точная навеска) испытуемого жирного масла помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл гексана, перемешивают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и снова перемешивают (испытуемый раствор). Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 232 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют гексан.

Индекс окисленности жирного масла (*ИО*) рассчитывают по формуле:

$$ИО = A_{232} / (a \cdot 2) \cdot l,$$

где A_{232} – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 232 нм;
 a – навеска жирного масла, г;
 l – толщина слоя кюветы, см.

Неомыляемые вещества. Количество веществ, содержащихся в жирном масле, не подвергшихся щелочному гидролизу и перешедших в липофильный растворитель из спирто-щелочной реакционной смеси, определяют по следующей методике.

Около 3 г (точная навеска) испытуемого масла помещают в колбу вместимостью 250 мл со шлифом, прибавляют 20 мл свежеприготовленного калия гидроксида спиртового раствора 2 М и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч с момента начала кипения смеси. Затем в колбу прибавляют 80 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Полученная реакционная смесь должна быть прозрачной (при необходимости процесс гидролиза продолжают до получения прозрачного раствора). После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл. Колбу ополаскивают 60 мл воды, которую добавляют в ту же делительную воронку. Затем в воронку прибавляют 50 мл эфира и осторожно, не допуская образования эмульсии, взбалтывают. После разделения слоев верхний эфирный слой сливают в делительную воронку вместимостью 200 мл. Реакционную смесь обрабатывают аналогичным образом еще два раза порциями эфира по 25 мл, после чего водно-щелочной слой отбрасывают. При образовании стойкой эмульсии в воронку следует добавить 5 капель спирта 96 %. Объединенные эфирные извлечения в делительной воронке промывают несколькими порциями воды по 40 мл до исчезновения щелочной реакции в последней порции водного слоя (индикатор – фенолфталеин). Водные извлечения отбрасывают. Эфирный экстракт фильтруют через бумажный фильтр в высушенную до постоянной массы круглодонную колбу вместимостью 250 мл со шлифом. На бумажный фильтр предварительно помещают около 8 г натрия сульфата безводного. После окончания

фильтрования фильтр с натрия сульфатом промывают тремя порциями эфира по 10 мл, собирая фильтрат в ту же колбу. Эфир отгоняют на роторном испарителе при температуре водяной бани не выше 40 °С досуха. Колбу с сухим остатком сушат при комнатной температуре до удаления запаха эфира, а затем сушат по постоянной массы при температуре 100 – 105 °С.

Содержание неомыляемых веществ в жирном масле в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{a},$$

где a – навеска испытуемого масла, г;

m_1 – масса пустой колбы, г;

m_2 – масса колбы с остатком после высушивания, г.

Примечание: Приготовление калия гидроксида спиртового раствора 2 М. 5,6 г калия гидроксида растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Посторонние жирные масла. Обнаружение возможной примеси посторонних жирных масел проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на жирное масло конкретного наименования.

Летучие вещества. Содержание летучих веществ в жирном масле не должно превышать 0,15 %. Определение проводят методом высушивания 5 г (точная навеска) жирного масла при 100 – 105 °С до постоянной массы.

Остаточные органические растворители. Определяют в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Парафин, воск, смоляные и минеральные масла. 1,0 г испытуемого жирного масла помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М и нагревают с обратным холодильником на водяной бане при периодическом перемешивании в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной

температуры к реакционной жидкости прибавляют 25 мл воды и перемешивают. Полученная жидкость должна быть прозрачной.

Примечание: *Приготовление калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М.* 1,4 г калия гидроксида растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Альдегиды. Около 1,0 г испытуемого жирного масла помещают в пробирку вместимостью 10 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и осторожно взбалтывают в течение 1 мин. После этого к реакционной смеси прибавляют 1 мл свежеприготовленного флороглюцина раствора в эфире 0,1 % и осторожно встряхивают содержимое. Не должно наблюдаться розового или красного окрашивания.

Вода, белки. 1,0 г испытуемого жирного масла помещают в пробирку вместимостью 10 мл, прибавляют 2 мл бензина авиационного и перемешивают. Раствор должен быть прозрачным и в нем не должно наблюдаться образования осадка.

Содержание воды в жирном масле, предназначенном для приготовления растворов для парентерального введения, определяют по методу Фишера из навески 3,0 г. Содержание воды не должно превышать 0,3 %.

Мыла. Содержание мыла в жирном масле, используемом для приготовления растворов для парентерального введения, не должно быть более 0,001 %. Содержание мыла в жирном масле, используемом для иных целей, не должно быть более 0,01 %.

Определение мыла в невысыхающих жирных маслах (миндальное, персиковое и др.), предназначенных для приготовления растворов для парентерального введения, проводится по нижеприведенной методике.

Около 5,0 г (точная навеска) жирного масла сжигают в фарфоровом тигле и прокаливают. Остаток не должен превышать 0,01 %. К остатку в тигле прибавляют 1 мл свежeproкипяченной воды, растворяют при нагревании на водяной бане и добавляют 2 капли раствора фенолфталеина

1 %. Жидкость не должна быть окрашена, или появившееся слабо-розовое окрашивание должно быстро исчезнуть.

В жирных маслах, предназначенных для внутреннего и наружного применения и не предназначенных для приготовления растворов для парентерального введения, определение мыла проводят по следующей методике: 50 мл воды помещают в коническую плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 10 капель фенолфталеина раствора 1 % и кипятят на плитке в течение 1 мин, при этом жидкость должна быть бесцветной. Затем к горячей воде прибавляют 5,0 г масла, взбалтывают и кипятят в течение 5 мин, после чего колбу с эмульсией охлаждают до комнатной температуры. Колбу ставят на лист белой бумаги и прибавляют еще 10 капель фенолфталеина раствора 1 %. Водный слой должен быть бесцветным.

Фосфорсодержащие вещества. Определяют в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на жирное масло конкретного наименования. Содержание фосфорсодержащих веществ должно быть не более 0,5 % в пересчете на стеароолеолецитин или не более 0,044 % в пересчете на P_2O_5 .

Цианиды, синильная кислота. Определение остаточных количеств цианидов и синильной кислоты в жирных маслах, получаемых из семян растений семейства розоцветных, проводят по следующей методике. В коническую колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл испытуемого жирного масла и прибавляют 5 мл серной кислоты разведенной 16 %. Колбу неплотно закрывают корковой пробкой со щелью в нижней части пробки по диаметру. В щель вставляют полоску фильтровальной бумаги шириной 1 см и такой длины, чтобы нижний край полоски находился на 1 – 1,5 см над уровнем содержимого колбы. Колбу закрывают пробкой со вставленной полоской и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. Затем колбу снимают, кончик полоски, смоченный натрием гидроксида раствором 10 %, отрезают и помещают на дно фарфоровой чашки. На кусочек бумаги в чашке наносят

1 каплю железа(II) сульфата раствора насыщенного, чашку нагревают на водяной бане в течение 1 мин. Затем на тот же кусочек наносят 1 каплю железа(III) хлорида раствора 5 % и 1 каплю хлористоводородной кислоты концентрированной. На дне чашки не должно наблюдаться голубого или синего окрашивания.

Тяжелые металлы. Содержание тяжелых металлов должно быть не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Объем содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Извлекаемый объем. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем» для лекарственных форм для приема внутрь или ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота». Требования к микробиологической чистоте устанавливаются в зависимости от назначения жирного масла.

Стерильность. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность», установленными для стерильных лекарственных средств, произведенных на основе жирных масел.

Количественное определение

Количественное определение биологически активных веществ в жирных маслах проводят с использованием методов газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и других методов, указанных в фармакопейных статьях или нормативной документации на конкретные виды жирных масел.

Количественное определение экзогенных антиоксидантов. Если для стабилизации жирного масла был использован дополнительно введенный экзогенный антиоксидант, то его количественное определение проводят в

соответствии с методикой и нормами, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации на жирное масло.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Жирные масла упаковывают в стеклянную, металлическую или другую хорошо укупоренную тару, заполненную доверху. Вид упаковки указан в фармакопейной статье или нормативной документации на жирное масло.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В прохладном, защищенном от света месте, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации на жирное масло.

СРОК ГОДНОСТИ

В соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на жирное масло. Устанавливают отдельно для жирного масла «ангро» и для расфасованного без вскрытия упаковки. Для расфасованного жирного масла указывают срок годности после первого вскрытия потребителем упаковки с жирным маслом.

**Определение содержания
радионуклидов в лекарственном
растительном сырье и
лекарственных растительных
препаратах**

ОФС.1.5.3.0001.15

Взамен ОФС 42-0011-03

Требования настоящей общей фармакопейной статьи применяются в отношении лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, независимо от формы выпуска, на этапах разработки и постановки на производство лекарственных средств, при переработке, производстве, хранении, транспортировании, закупке, ввозе в страну, сертификации и реализации (далее обращение лекарственного растительного сырья/препаратов).

Государственному контролю на радиационную безопасность подлежит лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты, выпускаемые предприятиями различных форм собственности на территории Российской Федерации и ввозимые на территорию Российской Федерации.

Термины и определения

В настоящей общей фармакопейной статье применяются следующие термины и определения:

Счетный образец - аналитическая проба - определенное количество пробы, выделенной методом квартования из объединенной пробы, для измерения её радиационных параметров.

Радиоактивность - свойство некоторых радионуклидов подвергаться радиоактивному распаду.

Активность радионуклида – число ядерных превращений (N), происходящих в данном количестве вещества, в промежуток времени (t),

отнесенное к этому промежутку времени:

$$A = - dN/dt.$$

Единица активности в СИ – Беккерель (Бк) – одно ядерное превращение в секунду.

Зиверт (Зв) – единица эквивалентной дозы, соответствующей определенному виду излучения (α , β , γ), т.е. количество излучения, которое проникло внутрь с учетом тканевого сопротивления. $1 \text{ Зв} : 1000 = 1 \text{ мЗв}$ (миллизиверт).

Удельная активность радионуклида (a) – активность вещества (A), отнесенная к массе (m) испытуемой пробы:

$$a = A/m \text{ (Бк/кг)}.$$

Концентрирование удельной активности – процедура приготовления счетного образца путем высушивания, обугливания, озоления или химического концентрирования.

Средства измерения включают в себя необходимые для определения удельной активности радионуклидов цезия-137 и стронция -90:

- радиометрическую установку с приспособлениями для экспонирования счетных образцов;
- методики выполнения измерений на данной радиометрической установке;
- методики приготовления счетных образцов вместе с необходимыми устройствами, приспособлениями и инструментами.

Радиационный контроль – применение средств измерений для определения соответствия испытуемых образцов требованиям нормативов радиационной безопасности.

Общие положения

Настоящая общая фармакопейная статья рассматривает вопросы радиационного контроля лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП), в том числе и сборов из ЛРС,

применяемых в сфере обращения лекарственных средств.

Радиационный контроль лекарственных средств проводится в соответствии с требованиями закона «О радиационной безопасности населения» и «Правил сертификации лекарственных средств». Радиационный контроль лекарственных средств отечественного и зарубежного производства на территории Российской Федерации осуществляется уполномоченными на это органами.

При проведении радиационного контроля ЛРС и ЛРП выполняются следующие основные процедуры:

- отбор проб из партии ЛРС/серии ЛРП;
- приготовление счетных образцов с концентрированием удельной активности в случае необходимости;
- измерение активности стронция-90 и цезия-137 в счетных образцах;
- расчет результатов измерений и погрешности исследований;
- определение соответствия ЛРС/ЛРП критериям радиационной безопасности.

Отбор проб для радиационного контроля проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Подготовку счетных образцов ЛРС/ЛРП для определения удельной активности Sr-90 и Cs-137 проводят на основании настоящей общей фармакопейной статьи.

Метрологические характеристики средств измерений должны подтверждаться поверкой органами Государственной метрологической службы в установленные сроки с выдачей свидетельства о поверке.

Персонал, осуществляющий радиационный контроль ЛРС/ЛРП, должен пройти соответствующее обучение для работы на радиометрических установках, освоить методики приготовления счетных образцов и методики выполнения измерений.

Результатом измерения активности радионуклидов в счетном образце

является интервал значений активности от $(A - \Delta A)$ до $(A + \Delta A)$, в котором с вероятностью $P=0,95$ находится значение измеряемой величины A (Бк):

$$A - \Delta A < A \leq A + \Delta A, \quad (1)$$

где A – значение измеренной активности радионуклида на данной радиометрической установке, Бк;

ΔA – значение погрешности при измерении A на данной радиометрической установке, Бк.

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения: $A=75$ Бк; $\Delta A=20$ Бк.

$$75 - 20 < 75 \leq 75 + 20 \rightarrow 55 < 75 \leq 95$$

С вероятностью $P=0,95$ значение измеряемой величины A (Бк) находится в интервале от 55 до 95 Бк.

Если часть интервала от $(A - \Delta A)$ до A или $\{(A - \Delta A) - A\}$ находится в области отрицательных значений, то следует считать, что с вероятностью $P = 0,95$ значение величины A находится в интервале:

$$\text{от } 0 \text{ до } (A + \Delta A) \text{ или } \{0 - (A + \Delta A)\}. \quad (2)$$

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения: $A=15$ Бк; $\Delta A=20$ Бк.

$$15 - 20 < 15 \leq 15 + 20 \quad (1) \rightarrow 0 < 15 \leq 35 \quad (3)$$

С вероятностью $P=0,95$ значение измеряемой величины A (Бк) находится в интервале от 0 до 35 Бк.

Если значение измеренной активности $A < 0$, то следует считать, что значение величины A находится в интервале от 0 до ΔA или $(0 - \Delta A)$.

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения:

$$A = -5 \text{ Бк; } \Delta A = 20 \text{ Бк, т.к. } A < 0 - 5 < 0 \rightarrow 0 - 20. \quad (4)$$

С вероятностью $P=0,95$ значение измеряемой величины A (Бк) находится в интервале от 0 до 20 Бк.

Результатом определения удельной активности радионуклидов (a) в ЛРС/ЛРП является интервал, характеризуемый соотношением:

$$a - \Delta a < a \leq a + \Delta a,$$

где a – значение удельной активности радионуклида в исследуемом ЛРС/ЛРП, Бк/кг;

Δa – значение погрешности, Бк/кг.

Порядок отбора проб ЛРС/ЛРП

Порядок отбора проб ЛРС/ЛРП включает выделение однородной по радиационному составу пробы для приготовления счетных образцов. Отбор

проб проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Отбор пробы для радиационного контроля от партии ЛРС и от серии ЛРП имеют разные схемы отбора проб и разный объем выборки.

Отбор проб от партии представлен на схеме 1, отбор проб от серии ЛРП – на схеме 2.

Схема 1 – Порядок отбора проб от партии ЛРС для радиационного контроля и определения содержания радионуклидов



Схема 2 – Порядок отбора проб от серии ЛРП для определения содержания радионуклидов



Радиационный контроль ЛРС и ЛРП имеют право проводить уполномоченные на это организации.

Определение удельной активности цезия-137 и стронция-90 в ЛРС/ЛРП

Для измерения удельной активности цезия-137 и стронция-90 в ЛРС/ЛРП и определения соответствия ЛРС/ЛРП критериям радиационной безопасности при оптимальных затратах времени и средств предложены три варианта подготовки счетных образцов. В табл. 1 приведены массы ЛРС в зависимости от используемого варианта измерений. В случае отсутствия указаний в табл. 1, следует руководствоваться данными, приведенными в табл. 2. В табл. 2 приведены массы ЛРС/ЛРП в зависимости от морфологической группы и используемого варианта измерений.

Таблица 1 – Масса ЛРС/ЛРП в зависимости от используемого варианта измерений

№	Наименование ЛРС/ЛРП	Масса ЛРС/ЛРП (не менее), г					
		Определение Cs-137			Определение Sr-90		
		Вариант измерений			Вариант измерений		
		1-й	2-й	3-й	1-й в	2-й	3-й
1	Аллея корни	40	280	400	10	30	90
2	Аниса плоды	40	400	600	10	30	90
3	Аира корневища	45	300	600	8	30	90
4	Березы почки	50	450	600	8	30	90
5	Бессмертника цветки	15	150	250	4	30	90
6	Боярышника плоды	50	350	600	15	40	90
7	Брусники листья	30	170	350	8	40	90
8	Багульника побеги	30	225	350	5	40	90
9	Валерианы корневища с корнями	40	300	450	9	30	90
10	Девясила корневища и корни	50	350	650	10	30	90
11	Донника трава	25	150	300	6	30	90
12	Дуба кора	50	300	500	8	30	90
13	Душицы трава	25	200	300	6	30	90
14	Зверобоя трава	30	170	350	8	30	90
15	Крушины кора	25	300	400	8	30	90
16	Кукурузы столбики с рыльцами	26	150	250	8	30	90
17	Липы цветки	30	200	450	8	30	90
18	Лопуха корни	40	350	500	8	30	90
19	Льна семена	60	600	800	10	30	90
20	Мать и мачехи листья	30	200	350	7	30	90
21	Мелиссы трава	25	180	250	6	30	90
22	Можжевельника плоды	50	400	600	12	30	90
23	Ламинарии слоевидные	40	600	800	15	30	90
24	Мяты листья	25	180	250	8	30	90
25	Ноготков цветки	16	180	270	6	30	90
26	Ортосифона листья (почечный)	30	260	400	8	30	90
27	Пижмы цветки	25	220	350	5	30	90

28	Подорожника листья	35	280	400	6	30	90
29	Пустырника трава	20	180	300	5	30	90
30	Расторопши плоды	50	500	800	12	30	90
31	Родиолы корневища и корни	30	200	400	5	30	90
32	Рябины плоды	60	370	600	12	30	90
33	Сенны листья	40	180	250	8	30	90
34	Спорыша трава	25	220	350	5	30	90
35	Солодки корни	30	270	400	10	30	90
36	Сосны почки	25	150	300	5	30	90
37	Тмина плоды	45	300	500	10	30	90
38	Толокнянки листья	35	200	450	8	30	90
39	Тысячелистника трава	15	200	300	4	30	90
40	Укропа плоды	40	330	500	9	30	90
41	Фасоли створки	20	180	280	6	30	90
42	Фенхеля плоды	40	380	500	9	30	90
43	Фиалки трава	25	200	300	6	30	90
44	Хвоща трава	25	130	280	8	30	90
45	Хмеля шишки	20	190	300	4	30	90
46	Чабреца трава	30	170	300	6	30	90
47	Чага	25	350	400	6	30	90
48	Черники побеги	25	150	28	4	30	90
49	Череды трава	25	200	300	8	30	90
50	Чистотела трава	30	150	300	6	30	90
51	Шалфея листья	35	250	350	7	30	90
52	Шиповника плоды	50	400	600	13	30	90
53	Эвкалипта листья	30	240	400	9	30	90
54	Элеутерококка корневища и корни	40	400	600	9	30	90
55	Эрвы шерстистой трава	25	200	350	5	30	90

Таблица 2 – Масса ЛРС/ЛРП в зависимости от морфологической группы и используемого варианта измерений

№	Наименование ЛРС/ЛРП	Масса [*] ЛРС/ЛРП (не менее), г					
		Определение Cs-137			Определение Sr-90		
		Вариант измерений			Вариант измерений		
		1-й	2-й	3-й	1-й	2-й	3-й
1	Побеги	30	200	340	6	30	90
2	Почки	40	300	450	7	30	90
3	Цветки	25	200	300	6	30	90
4	Плоды	50	400	600	10	30	90
5	Листья	30	200	320	8	30	90
6	Трава	30	200	300	6	30	90
7	Кора	35	250	400	7	30	90
8	Семена	60	600	800	10	30	90
9	Корни	40	330	500	10	30	90
10	Корневища	40	360	600	8	30	90
11	Корневища с корнями	40	300	450	9	30	90

*Приведенные массы являются усредненными

Определение Cs-137
при времени экспонирования счетного образца 1800 с (30 мин)

1-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – чашки Петри, измельчение указанной массы до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм (содержимое фильтр-пакетов может использоваться без дополнительного измельчения).

2-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – сосуда Маринелли объемом 1 л, ЛРС/ЛРП категории «измельченное» (как правило, проходящее сквозь сито отверстиями размером 7 мм); допускается без измельчения анализировать цельное сырье/препарат, например: боярышника плоды, шиповника плоды, льна семена и т.д., при достаточной насыпной массе.

3-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – сосуда Маринелли объемом 1 л, измельчение указанной массы ЛРС/ЛРП до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Определение Sr-90
при времени экспонирования счетного образца 1800 с (30 мин)

1-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – кюветы, измельчение указанной массы до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

2-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – кюветы, измельчение с последующим озолением указанной массы.

3-й вариант измерений предполагает использование аттестованной геометрии – кюветы, измельчение с последующим радиохимическим концентрированием.

Приготовление счетных образцов и измерение активности Sr-90 и Cs-137 в пробах ЛРС/ЛРП

Подготовка проб к измерениям

Подготовка проб к измерениям заключается в отборе пробы, предварительном измельчении ЛРС/ЛРП с целью приготовления однородного счетного образца в соответствии с выбранным вариантом измерения, выборе измерительной кюветы, определении объема ее заполнения, определении схемы анализа.

Пробу ЛРС/ЛРП предварительно измельчают с помощью ножа, секатора, мясорубки, терки, а затем в специальных лабораторных измельчителях, дробилках и мельницах, возможно использование кофемолки.

В зависимости от выбранного варианта измерения радиологическому испытанию подвергают ЛРС/ЛРП, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, 2 мм и 1 мм.

Навеску для радиологического испытания определяют для каждого вида ЛРС/ЛРП с учетом выбора аттестованной геометрии, которая не может быть меньше указанной в табл. 1.

Приготовление счетного образца для измерения Cs-137 и Sr-90 зависит от измельченности поступившего на анализ сырья/препарата, используемого метода измерения и чувствительности используемой радиометрической установки. Выбор аттестованных геометрий (гамма-спектрометр, сосуд Маринелли 1 л, чашка Петри; бета-спектрометр – измерительная кювета) зависит от результатов, полученных в процессе анализа (см. варианты измерений).

Приготовление счетного образца для определения

удельной активности Cs-137

Пробу измельчают и просеивают сквозь сито с отверстиями размером 2 мм для аттестованной геометрии – чашки Петри (1-й вариант измерений), 7 мм (2-й вариант измерений) или 2 мм (3-й вариант измерений) для сосуда Маринелли. Измельченное ЛРС/ЛРП помещают в сосуд Маринелли или в чашку Петри, масса сырья/препарата не может быть меньше указанной в табл. 1, и измеряют активность Cs-137.

Для определения массы измеряемого счетного образца сосуд взвешивают до и после его заполнения.

При получении отрицательного результата в чашке Петри (т.е. сырье/препарат относится ко второй или третьей группе радиационной безопасности) увеличивают массу счетного образца (2-й вариант измерений) и повторно проводят измерение активности цезия-137 в сосуде Маринелли. При получении результатов, соответствующих третьей группе по критериям радиационной безопасности, продолжают исследование по 3-му варианту измерений. Схема проведения радиационного контроля приведена на схеме 3.

Приготовление счетного образца для определения удельной активности Sr-90

Данная методика определения удельной активности Sr-90 рассчитана на равномерное распределение радионуклида по объему пробы, поэтому проба должна быть тщательно измельчена и перемешана:

- а) отобранную пробу измельчают и просеивают сквозь сито с отверстиями размером 1 мм;
- б) измельченное и просеянное ЛРС/ЛРП помещают в измерительную кювету; масса счетного образца должна быть не меньше указанной в табл. 1. Для определения массы измеряемого образца измерительную кювету взвешивают до и после заполнения;
- в) измельченное и просеянное ЛРС/ЛРП помещают в измерительную кювету, тщательно перемешивают шпателем и уплотняют в ней специальным приспособлением; высота слоя счетного образца не должна превышать глубины кюветы;
- г) проводят определение активности счетного образца на бета-

спектрометре в соответствии с инструкцией к данному спектрометрическому комплексу. Как правило, при анализе ЛРС/ЛРП требуется 2-й вариант измерений.

С целью уменьшения погрешности измерения (Δa) допускаются методы термического и радиохимического концентрирования. Первоначально проводят термическое концентрирование, основанное на озолении массы счетного образца согласно данным табл. 1.

Если по результатам 2-го варианта измерений $a - \Delta a < H$, то необходимо использовать 3-й вариант измерений с извещением контролирующей организации производителя или дистрибьютора оптовой сети. Если на основании повторного исследования вновь нельзя сделать однозначного вывода, то для дальнейшего концентрирования используют радиохимические методики.

При необходимости увеличения чувствительности применяемых методов измерения возможно использование утвержденных в установленном порядке методов термохимического концентрирования или частичного, или полного радиохимического выделения определяемого радионуклида. Допускается также использование методов концентрирования и радиохимического выделения, не указанных в приложениях, при условии их метрологической аттестации в РФ.

Термическое концентрирование

Термическое концентрирование основано на озолении порошка счетного образца ЛРС/ЛРП. Основным требованием является наличие достаточного объема пробы для получения от 3 до 7 г золы. Необходимо учитывать, что при озолении происходит концентрирование в среднем в 10 раз. Таким образом, навеска для озоления может составлять от 30 (2-й вариант измерений) до 90 г в случае необходимости увеличения массы счетного образца в 3-ем варианте измерений.

Измельченное и просеянное ЛРС/ЛРП переносят в предварительно взвешенные тигли. Для определения массы образца заполненные тигли вновь взвешивают и помещают в муфельную печь для озоления при температуре

600-800 °С. После окончания концентрирования золу переносят в измерительную кювету, выравнивают и уплотняют в ней с помощью специального приспособления. Проводят определение массы зольного остатка (с точностью до 0,01 г) по разнице между массой чистой и заполненной кюветы. Масса золы в кювете должна составлять от 3 до 7 г в случае проведения дополнительных измерений, необходимость которых указана в разделе «Измерение активности радионуклидов».

К термическому концентрированию относится также сушка при поступлении на испытание свежесобранного сырья.

Методики радиохимического концентрирования проб для бета-спектрометрического определения Sr-90 в ЛРС/ЛРП

I. *Используемые вещества:* хлористоводородная кислота концентрированная, азотная кислота концентрированная, аммиака раствор концентрированный 32 %, насыщенные растворы щавелевой кислоты и аммония карбоната, натрия гидроксида раствор 20 %, «универсальная» индикаторная бумага, растворы носителей иттрия 50 мг/мл и стронция 50 мг/мл в пересчете на металлы, спирт и диэтиловый эфир.

II. *Приготовление раствора носителя иттрия.* Растворяют 21,6 г иттрия нитрата гексагидрата в 100 мл воды дистиллированной. Раствор фильтруют от возможных примесей через бумажный фильтр с синей полосой и отбирают параллельно три пробы по 1 мл. Каждую пробу разбавляют водой до 5 мл. Отобранные пробы нагревают до 80-90 °С и к каждой прибавляют 5 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок выдерживают в растворе в течение 2-3 ч и фильтруют через пористый фильтр № 4, промывают 2 раза водой, спиртом и диэтиловым эфиром (по 2-3 мл). Осадок высушивают до постоянной массы при 45-50 °С. Весовая форма для пересчета – иттрия оксалат наногидрат – $Y_2(C_2O_4)_3 \cdot 9 H_2O$. Коэффициент пересчета на металл – 0,295.

III. *Приготовление раствора носителя стронция.* Растворяют 12,1 г стронция нитрата в 100 мл воды дистиллированной. Раствор фильтруют, отбирают три пробы по 1 мл и разбавляют каждую до 5 мл водой. Пробы нагревают до 80-90 °С и прибавляют при перемешивании 2 мл насыщенного раствора аммония карбоната. Осадок выдерживают в течение 1 ч и фильтруют

через пористый фильтр № 4. Промывают по два раза водой, спиртом и диэтиловым эфиром (2-3 мл), высушивают до постоянной массы при 110-120 °С. Весовая форма для пересчета – стронция карбонат – SrCO_3 . Коэффициент пересчета на металл 0,594.

IV. *Ход анализа.* Перед проведением анализа осадок носителей смывают с фильтров минимальным количеством хлористоводородной кислоты раствора 6 М и собирают в отдельном стаканчике (т.е. по 50 мг стронция и иттрия в пересчете на металл).

1) К навеске озоленного ЛРС/ЛРП прибавляют раствор, содержащий носители. Нагревают на песчаной бане и постепенно прибавляют смесь концентрированных хлористоводородной и азотной кислот в объемном соотношении 3:1 ("царская водка") до растворения основной массы озоленного сырья/препарата (приблизительно 200 мл).

2) Осадок декантируют и промывают «царской водкой». Промывной раствор прибавляют к фильтрату. Осадок промывают водой и высушивают в сушильном шкафу при 80-90 °С, охлаждают и проводят регистрацию активности осадка на бета-спектрометре (как правило, активность подобных осадков находится на уровне фона).

3) Фильтрат осторожно нейтрализуют натрия гидроксида раствором 20 % при постоянном перемешивании до pH 3-4, используя универсальную индикаторную бумагу. Затем к раствору приливают при перемешивании аммиака раствор концентрированный 25 % до pH 8 и 5 мл насыщенного раствора аммония карбоната.

4) Выпавший осадок выдерживают в течение 30 мин в равновесии с раствором и фильтруют на воронке Бунзена, размером чуть меньше размера счетной кюветы, через двойной бумажный фильтр с синей полосой.

5) Осадок промывают 2-3 раза водой по 3-5 мл, спиртом и подсушивают (промыванием диэтиловым эфиром).

6) Фильтр с осадком осторожно снимают с воронки и помещают в счетную кювету.

7) Сушат при температуре 40-45 °С и измеряют активность образца на бета-спектрометре без учета удельной активности калия.

Примечания

1. При проведении концентрирования необходимо добавлять по 1 порции каждого раствора носителя на 2-3 г золы ЛРС/ЛРП.

2. Методика гарантирует выделение более 90 % равновесных стронция-90 и иттрия-90.

Измерение активности радионуклидов

Измерение удельной активности Cs-137. Для измерения удельной активности Cs-137 используют гамма-спектрометры со сцинтилляционными и полупроводниковыми детекторами, находящиеся в свинцовой защите, толщина которой должна быть не менее 50 мм. Минимальная измеряемая активность гамма-спектрометров должна составлять 3-10 Бк.

Установленная настоящей общей фармакопейной статьей масса анализируемой пробы в зависимости от выбранного варианта измерения обеспечивает приемлемую погрешность получаемого результата при измерении в стандартной геометрии – чашка Петри или сосуд Маринелли (1 л).

Первоначально измерение активности проводят в аттестованной геометрии – чашке Петри; если по 1-му варианту измерений чувствительности гамма-спектрометра не хватает для получения достоверного результата, увеличивают массу счетного образца и в качестве измерительного сосуда используют сосуд Маринелли (2-й или 3-й вариант измерений).

Измерение активности проводят в соответствии с инструкцией к используемому гамма-спектрометру и настоящей общей фармакопейной статьей.

Последовательность проведения радиационного контроля приведена на схеме 3.

Примечание – Допускается использование компьютеризованных гамма-, бета-спектрометрических комплексов с программным обеспечением.

Измерение удельной активности Sr-90. Для измерения удельной активности Sr-90 используют бета-спектрометры с детектором, находящиеся в свинцовой защите. Минимальная измеряемая активность бета-спектрометров должна составлять 0,1-1,0 Бк.

Приготовленный счетный образец в соответствии с вариантом измерения

помещают в свинцовую защиту под детектор и проводят определение активности радионуклида.

Первоначально проводят измерение исходного (неозоленного) ЛРС/ЛРП в виде порошка с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм (1-й вариант измерений). В случаях, когда чувствительности бета-спектрометра не хватает для измерения активности радионуклида, сначала проводят термическое концентрирование (озоление) – 2-й вариант измерений; если при этом не происходит уменьшение погрешности измерения, то увеличивают навеску для последующего озолнения. Если полученный результат попадает в третью группу согласно критериям радиационной безопасности, то радиационный контроль продолжают, проводят радиохимическое концентрирование.

Последовательность проведения радиационного контроля приведена на схеме 4.

Измерение проб нулевой активности

Как правило, активность большинства испытуемых образцов ЛРС/ЛРП не превышает 1 % от нормативного показателя. Такие счетные образцы называются образцами с «нулевой» активностью. При радиационном контроле основной задачей становится проверка соответствия счетного образца следующему уравнению:

$$M_{npSr-90} = \frac{(A_0 \sqrt{H})_{Sr-90} \cdot \sqrt{t_0/t_{изм}}}{1 - (A_0 \sqrt{m_{np} \cdot H})_{Cs-137} \cdot \sqrt{t_0/t_{изм}}} \quad (5)$$

где H – допустимый уровень удельной активности радионуклида в испытуемом веществе;

m_{np} – масса счетного образца для определения удельной активности Sr-90 или Cs-137, кг;

$t_0 = 3600$ с – время измерения, соответствующее определению минимальной измеряемой активности A_0 ;

$t_{изм}$ – время измерения данного счетного образца, которое не должно превышать 3600 с, в секундах;

A_0 Sr-90 – минимальная измеряемая активность Sr-90 по алгоритму «с учетом 40К», в данном случае A_0 Sr-90 = 0,6 Бк, а при использовании алгоритма без учета 40 К A_0 Sr-90 = 1,0 Бк;

$A_0 \text{ Cs-137}$ — минимальная измеряемая активность Cs-137; для сосуда Маринелли 1л эта величина равна 3,4 Бк, а при использовании чашки Петри — 1,7 Бк.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

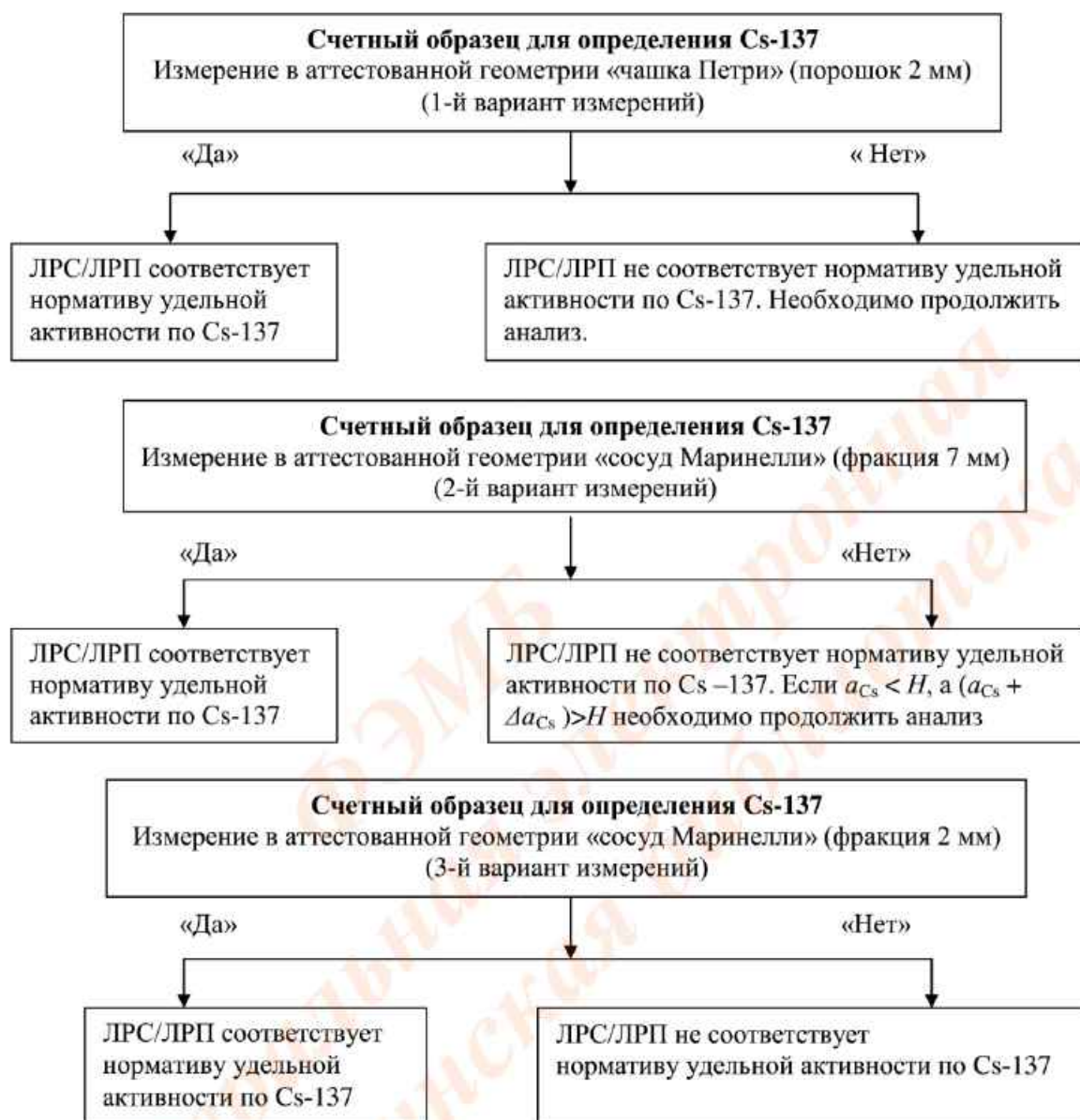


Схема 3 – Схема проведения радиационного контроля на содержание Cs-137

В схеме под утвердительным ответом «Да» подразумевается соответствие полученного результата нормативу удельной активности Cs-137 в ЛРС/ЛРП. Ответ «Нет» – если ЛРС/ЛРП относится ко второй или третьей группе (по критериям радиационной безопасности).

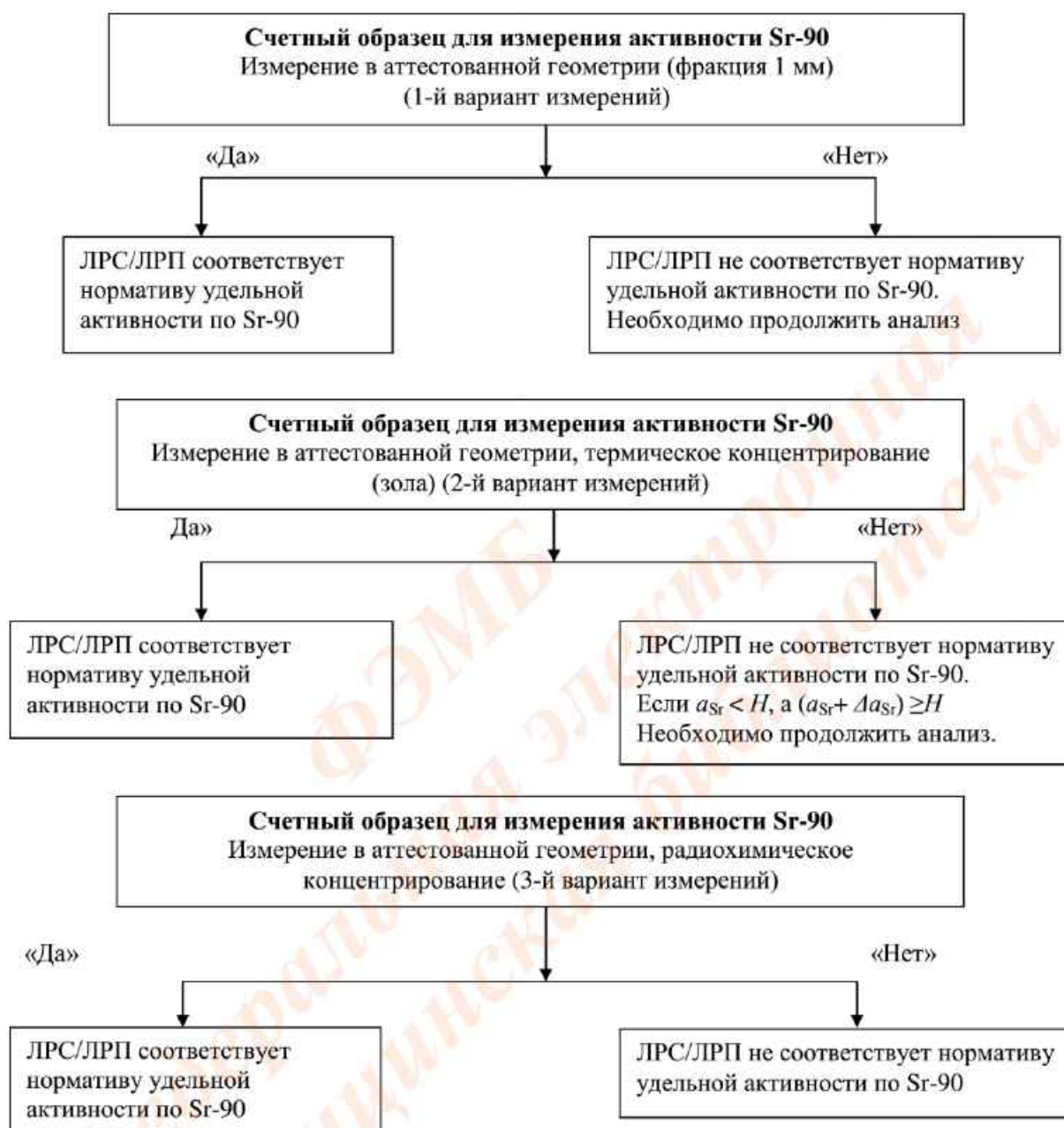


Схема 4 – Схема проведения радиационного контроля на содержание Sr-90

В схеме под утвердительным ответом «Да» подразумевается соответствие полученного результата нормативу удельной активности Sr-137 в ЛРС/ЛРП. Ответ «Нет» – если ЛРС/ЛРП относится ко второй или третьей группе (по критериям радиационной безопасности).

Измерение активных проб

Если по итогам проведенного радиационного контроля сырье/препарат по критериям радиационной безопасности относится к третьей группе, то окончательный вывод можно сделать только при соблюдении условия точности $\Delta B < 0,3$.

При измерении «активных проб» используют следующее уравнение:

$$\frac{(A_0)_{Sr-90}}{(m_{np} \cdot H)_{Sr-90}} + \frac{(A_0)_{Cs-137}}{(m_{np} \cdot H)_{Cs-137}} = 0,3$$

Исходя из него, можно вычислить массу счетного образца по следующему выражению:

$$m_{np \text{ Sr-90}} = \frac{1}{0,3 - (A_0/m_{np} \cdot H)_{Cs-137}} \cdot \frac{(A_0)_{Sr-90}}{(H)_{Sr-90}}$$

Определение соответствия ЛРС/ЛРП требованиям радиационной безопасности

Для определения соответствия ЛРС/ЛРП критериям радиационной безопасности используют показатель соответствия B и погрешность его определения ΔB , значения которых рассчитывают по результатам измерений удельной активности Sr-90 и Cs-137 в пробе:

$$B = (a/H)_{Sr} + (a/H)_{Cs} ,$$

$$\Delta B = \sqrt{(\Delta a/H)^2_{Sr}} + \sqrt{(\Delta a/H)^2_{Cs}} ,$$

где a – измеренное значение удельной активности радионуклида в пробе;

H – допустимый уровень удельной активности радионуклида в испытуемом веществе;

Δa – абсолютная доверительная ($P = 0,95$) погрешность измерения удельной активности.

ЛРС/ЛРП считается соответствующим критерию радиационной безопасности (первая группа), если:

$$B + \Delta B \leq 1.$$

ЛРС/ЛРП должно признаваться несоответствующим критерию радиационной безопасности (вторая группа), если:

$$B - \Delta B > 1.$$

Переход на 2-й и 3-й вариант измерений проводится с одновременным извещением производителя или дистрибьютора розничной сети.

Если величина $(B+\Delta B)>1$, а $(B-\Delta B) \leq 1$ (третья группа), то прежде чем принять решение по растительному сырью/препарату следует иметь в виду, что при проведении более точных измерений существует вероятность уменьшения ΔB и перенос отнесения ЛРС/ЛРП из третьей группы в первую. В подобной ситуации рекомендуется:

- при измерении удельной активности Cs-137 увеличить массу счетного образца, используя для измерения вместо чашки Петри сосуд Маринелли (1,0 л);
- при измерении удельной активности Sr-90 первоначально озолить сырье/препарат и провести повторное измерение, если при этом растительное сырье/препарат остается в третьей группе, необходимо увеличить навеску растительного сырья/препарата для озоления с 30 до 70 г или использовать метод радиохимического концентрирования, или увеличить время экспозиции до 3600 с.

Результаты измерений удельной активности радионуклидов в пробе должны удовлетворять условию точности:

$$\Delta B < 0,3.$$

ЛРС/ЛРП, качество которого не соответствует установленным нормативам, изымается из обращения.

Для определения соответствия ЛРС/ЛРП критериям радиационной безопасности используют нормативы, приведенные в табл. 3.

Таблица 3 – Пределы допустимого содержания радионуклидов в ЛРС/ЛРП

Радионуклиды	Допустимая удельная активность радионуклида, Бк/кг, не более
Cs-137	400
Sr-90	200

**Определение степени зараженности
лекарственного растительного сырья и
лекарственных растительных препаратов
вредителями запасов**

ОФС.1.5.3.0002.15

**Взамен ГФ X,
ст. ГФ XI, вып. 1**

Исследование на наличие вредителей запасов проводят в обязательном порядке при приемке лекарственного растительного сырья/препаратов, а также ежегодно при хранении.

Лекарственное растительное сырье/препараты проверяют на наличие живых и мертвых вредителей и их личинок путем осмотра невооруженным глазом и/или с помощью лупы (5-10×) при внешнем осмотре партии/серии лекарственного растительного сырья/препарата в специально выделенной пробе, а также при определении измельченности и содержания примесей. Кроме того, обращают внимание на наличие поражения лекарственного растительного сырья/препаратов грызунами, включая упаковочные материалы. При осмотре лекарственного растительного сырья/препаратов обращают внимание на наличие частей сырья/препарата, поврежденных вредителями запасов, тщательно осматривают швы, складки упаковочного материала, щели в ящиках.

При обнаружении в лекарственном растительном сырье/препарате вредителей запасов определяют степень его зараженности, используя специально выделенную пробу (согласно ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»).

Анализ должен быть проведен не позднее 2 сут с момента поступления пробы на анализ. В холодный период года (среднесуточная температура воздуха ниже 10 °С) проба сырья перед анализом должна быть выдержана

при комнатной температуре не менее 1,5 – 2 ч.

Аналитическую пробу лекарственного растительного сырья/препарата взвешивают с погрешностью ± 5 г, затем просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм. В сырье/препарате, прошедшем сквозь сито, проверяют наличие клещей; в сырье/препарате, оставшемся на сите, – наличие моли, точильщика и их личинок и наличие других живых и мертвых вредителей. Количество клещей и других вредителей подсчитывают, используя лупу; моли, точильщика, их личинок и других вредителей – невооруженным глазом или с помощью лупы.

При обнаружении вредителей запасов в серии лекарственного растительного препарата её бракуют.

Количество вредителей на 1 кг лекарственного растительного сырья (X) определяют по формуле:

$$X = \frac{N \cdot 1000}{m},$$

где N – число обнаруженных вредителей в пробе (в сырье, прошедшем сквозь сито, и/или в сырье, оставшемся на сите);
 m – масса пробы, взятая для проведения анализа, г.

Вычисление проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

Степень зараженности лекарственного растительного сырья в зависимости от количества обнаруженных вредителей в 1 кг лекарственного растительного сырья определяют в соответствии с данными, приведенными в таблице.

Таблица – Степень зараженности лекарственного растительного сырья вредителями запасов

Степень зараженности	Виды вредителей запасов, количество шт. в 1 кг лекарственного растительного сырья	
	клещи (клещ мучной (<i>Tyroglyphus farina</i> L.), клещ волосатый (<i>Glyciphagus destructor</i> Schrank.), клещ хищный (<i>Cheyletus eruditus</i> Schrank.),	амбарная моль (<i>Tinea granella</i> L.), хлебный точильщик (<i>Sidotrepa panicea</i> L.), их личинки и

	сухофруктовый клещ (<i>Carpoglyphus lactis</i> L.) и др.)	др.
I	Не более 20	Не более 5
II	Более 20; свободно передвигаются по поверхности сырья-и не образуют сплошных масс	6-10
III	Образуют сплошные войлочные массы, движение их затруднено	Более 10

В случае обнаружения в лекарственном растительном сырье живых вредителей запасов его подвергают дезинсекции. Перед использованием в производстве лекарственных средств лекарственное растительное сырье, прошедшее дезинсекцию, просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм (при зараженности клещами или мелкими вредителями-насекомыми) или с размером отверстий 3 мм (при зараженности другими вредителями).

После обработки сырье используют в зависимости от степени зараженности. При I степени зараженности сырье может быть допущено к медицинскому применению, при II степени и в исключительных случаях при III степени зараженности сырье может быть использовано для переработки с целью получения индивидуальных веществ.

**Техника микроскопического и
микрохимического исследования
лекарственного растительного
сырья и лекарственных
растительных препаратов**

ОФС.1.5.3.0003.15

**Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1,
стр. 277, стр. 282**

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает единые требования к технике проведения микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, с целью дальнейшего определения их соответствия требованиям по показателю «Подлинность».

Термины и определения

Анатомо-диагностические признаки — совокупность признаков анатомического строения лекарственного растительного сырья, отличающих данное лекарственное растительное сырье/препарат от других видов при диагностике его подлинности.

Микроскопическое исследование — исследование, при котором в общей картине анатомического строения различных морфологических органов растений идентифицируются под микроскопом характерные анатомо-диагностические признаки; при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата.

Микрохимическое исследование — исследование, при котором проводят микрохимические реакции одновременно с микроскопическим анализом лекарственного растительного сырья/препарата, наблюдая их

результаты под микроскопом; при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата. Обычно микрохимическое исследование включает микрохимические реакции для обнаружения действующих и сопутствующих веществ: алкалоидов, дубильных веществ, слизи, инулина, крахмала и др.

Гистохимическое исследование – исследование, при котором проводят гистохимические реакции одновременно с микроскопическим анализом лекарственного растительного сырья (препарата); при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата. Обычно гистохимическое исследование включает гистохимические реакции, позволяющие провести окрашивание анатомических структур и тканей: эфиромасличных железок, вместилищ, одревесневших оболочек сосудов, механических волокон, кутинизированных оболочек (кутикулу, покрывающую эпидермис), опробковевших оболочек покровной ткани (пробку) и др.

Микропрепарат – препарат исследуемого объекта, подготовленный на предметном стекле с целью его дальнейшего изучения под микроскопом.

Поперечный срез – срез морфологического органа растительного объекта, выполненный перпендикулярно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на поперечном срезе рассматривают диаметр сосудов, механических волокон, млечников, вытянутых вместилищ, структуру сосудисто-волокнистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в поперечном сечении.

Продольный срез – срез морфологического органа растительного объекта, выполненный параллельно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на продольном срезе изучают длину сосудов, механических волокон и других вытянутых структур; характер утолщенности (перфорации) стенок этих структур; строение сосудисто-

волокнистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в продольном сечении.

«Давленный» микропрепарат – микропрепарат, полученный из морфологического органа растительного объекта путем раздавливания его на предметном стекле обратным концом препаровальной иглы или скальпелем с целью получения более тонкого слоя исследуемого объекта и возможности детального рассмотрения его структур. Обычно «давленные» микропрепараты готовят из плодов, подземных органов, коры, крупного порошка различных морфологических органов и др.

Общие положения

Техника приготовления микропрепаратов из лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов разнообразна и зависит от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния лекарственного растительного сырья/препарата – цельного, измельченного или порошка.

Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов совпадает, поэтому она представлена по морфологическим группам.

Количественная оценка анатомо-диагностических признаков проводится во всех рассматриваемых морфологических группах лекарственного растительного сырья одинаково. Частота встречаемости анатомо-диагностических признаков обычно учитывается на эпидермисе листьев, черешков, лепестков, чашелистиков, цветоножек, стеблей, плодов, семян, плодоножек. При необходимости измеряется толщина лепестков и чашелистиков.

Для определения подлинности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов может быть также использован метод люминисцентной микроскопии. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала,

из которого готовят толстые срезы или препараты порошка, и рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак-иллюминатор или объектив.

Люминисцентная микроскопия выполняется с помощью люминисцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминисцентными осветителями.

Препараты в люминисцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминисценцию.

Для приготовления микропрепаратов используют сухое лекарственное растительное сырье или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Листья

Цельное сырье. Для анализа цельных листьев берут цельные листья или кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок).

Просветляют одним из двух способов:

1. Несколько кусочков сырья помещают в колбу или пробирку, прибавляют натрия гидроксида раствор 5 %, разведенный водой (1:1), и кипятят в течение 2 – 5 мин в зависимости от толщины и плотности объекта, не допуская сильного размягчения. Более жесткие листья (толокнянка, брусника, эвкалипт) кипятят до 5 мин, более хрупкие листья (крапива, чистотел) кипятят до 2 мин. Затем содержимое переливают в стеклянный стакан, жидкость сливают через 2 – 4 слоя марли, которой закрывают стакан, и сырье тщательно промывают водой, каждый раз сливая воду через ту же марлю. Содержимое стакана переносят в небольшом количестве воды в чашку Петри. Частицы сырья, оставшиеся на марле, смывают в ту же чашку Петри. Из воды кусочки вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина

раствора 33 %.

2. Кусочки сырья кипятят в растворе хлоралгидрата, разведенного водой (1:1), в течение 5 – 10 мин (до просветления). Просветленный кусочек сырья помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина раствора 33 %.

Кусочки сырья, просветленные тем или иным способом и помещенные на предметное стекло, разделяют скальпелем или препаровальными иглами на две части, одну из них осторожно переворачивают. Кожистые и толстые листья раздавливают скальпелем или обратным концом препаровальной иглы. Кусочек черешка помещают на предметное стекло. Тонкие черешки раздавливают скальпелем или обратным концом препаровальной иглы для высвобождения эпидермиса. С толстых черешков снимают эпидермис с помощью препаровальных игл или бритвы, убирая грубые внутренние части черешка, мешающие получению хорошего микропрепарата эпидермиса. Объект накрывают покровным стеклом, при необходимости слегка сверху придавливают чистым обратным концом препаровальной иглы и слегка подогревают до удаления пузырьков воздуха, после охлаждения рассматривают лист с обеих сторон и эпидермис черешка под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При разных увеличениях, пользуясь макро- и микровинтом, исследуют верхний и нижний эпидермис, а также глубинные структуры листа, расположенные под эпидермисом (паренхима, включения, сосуды и т.д.).

При анализе толстых и кожистых листьев (эвкалипт, толокнянка, брусника) готовят поперечные срезы. При необходимости также готовят поперечные срезы черешков. Для чего используют два способа размачивания.

1. Листья (черешки) кипятят в растворе хлоралгидрата в течение 10 мин.

2. При отсутствии хлоралгидрата выбранные листья (черешки) и их кусочки помещают в воду на 1 – 2 ч, после размачивания переносят в смесь

глицерин – вода – этанол (1 : 1 : 1), где выдерживают 1 – 2 сут до полного пропитывания тканей жидкостью. В этой жидкости материал можно хранить продолжительное время, для чего при приготовлении смеси к ней добавляют кристаллик фенола.

Из размоченных объектов делают срезы, зажимая кусочки листа (черешка) в бутылочную пробку (коровую) или сердцевину бузины. При использовании бутылочной пробки ее предварительно кипятят в воде 15 мин. Кусочек бузины или бутылочной пробки разрезают пополам и между двумя половинками зажимают кусочек листа. Для изготовления поперечных срезов поверхность кусочка следует подготовить так, чтобы она была строго перпендикулярна к оси черешка или жилке листа. Для поперечного среза из листа вырезают небольшой участок, так чтобы попала средняя или боковая жилка, срез ведут перпендикулярно к жилке. Готовые срезы помещают в чашку Петри с водой, откуда срезы вынимают, просматривают под микроскопом, отбирая удачные.

При использовании первого способа размачивания срезы для их изучения помещают на предметное стекло в раствор хлоралгидрата. При втором способе размачивания срезы требуют дополнительного просветления. Для чего их помещают в натрия гидроксида раствор 5 % на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают над пламенем горелки до полного просветления. После охлаждения микропрепарата с левой стороны покровного стекла помещают небольшой кусочек фильтровальной бумаги, а с правой начинают понемногу вводить пипеткой глицерина раствор 33 % до получения препарата с бесцветной включающей жидкостью. Полученный микропрепарат изучают под микроскопом.

Измельчённое сырьё. Для анализа берут кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок). Далее с выбранными кусочками поступают так же, как в случае с цельными листьями.

Порошок. Для изучения порошка можно использовать два способа

получения микропрепаратов.

1. На предметное стекло наносят 1 – 2 капли раствора хлоралгидрата и небольшое количество исследуемого порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной хлоралгидратом, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают до удаления пузырьков воздуха. Затем стекло слегка придавливают ручкой препаровальной иглы, выступившую по краям жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги. Порошки кожистых листьев просветляют кипячением в натрия гидроксида растворе 5 %.

2. При отсутствии хлоралгидрата на предметное стекло наносят 1 – 2 капли натрия гидроксида раствора 5 % и небольшое количество порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной натрия гидроксида раствором 5 %, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают над пламенем горелки до просветления. После охлаждения удаляют фильтровальной бумагой натрия гидроксида раствор с одной стороны покровного стекла, добавляя с противоположной стороны пипеткой глицерина раствор 33 %.

Цветки

Цельное сырье. Для анализа берут чашечку, венчик, тычинки, пестик, цветоножку, также, если есть, листочки обертки корзинки, прицветные листы и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Способы просветления используют те же, что и для листьев. Для исследования пыльцы раздавливают пыльники тычинок обратным концом препаровальной иглы. Следует учесть, что тонкие лепестки кипятят в натрия гидроксида растворе 5 % не более 1 мин. Анализ цветоножки проводят аналогично анализу черешка листа. При необходимости делают поперечные срезы цветоножки.

Измельченное сырье. Для анализа берут кусочки чашечки, венчика, цветоножки, а также тычинки, пестик и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Если сырье имеет небольшие размеры, то берут

цельные чашечку и венчик. Далее с выбранными кусочками поступают так же, как в случае с цельными цветками.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев.

Травы

Цельные травы. Для анализа берут цельные листья или кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок); чашечку, венчик, тычинки, пестик и цветоножку, при необходимости другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются; кусочки стеблей, если есть, и при необходимости плоды. Используют способы просветления, описанные для листьев, цветков и плодов.

Для исследования стеблей их обрезки кипятят в натрия гидроксида растворе 5 % в течение 3 – 5 мин в зависимости от толщины и грубости объектов. Эпидермис снимают скальпелем или препаровальными иглами; из остальных тканей готовят микропрепарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в хлоралгидрата растворе или глицерина растворе 33 %. При необходимости готовят поперечные срезы, для чего используют методику приготовления поперечных срезов черешка листа, учитывая, что при помещении кусочков стеблей между двумя половинками пробки необходимо сделать бритвой соответствующие углубления для предотвращения сдавливания тканей исследуемого объекта.

Измельченное сырье. Выбирают кусочки листьев, цветков, стеблей, плодов или при их небольших размерах цельные перечисленные объекты. Далее с ними поступают так же, как в случае с цельной травой.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам листьев.

Плоды и семена

Цельное сырье. Готовят препараты кожуры семени и околоплодника с поверхности или поперечные срезы.

Препараты кожуры и околоплодника с поверхности. 2 – 3 семени или плода кипятят в пробирке в натрия гидроксида растворе 5 % в течение 2 – 3 мин и тщательно промывают водой. Объект помещают на предметное стекло, препаровальными иглами отделяют кожуру семени или ткани околоплодника и рассматривают их в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %.

Ткани мезокарпия и эндокарпия рассматривают в давленных препаратах и на срезах. Давленные препараты получают при использовании обратного конца препаровальной иглы или скальпеля путем надавливания на объект в заключающей среде на предметном стекле.

Для приготовления срезов сухие плоды и семена предварительно размягчают, поместив их на 1 сут во влажную камеру (влажной камерой служит эксикатор с водой, в которую добавлено несколько капель хлороформа) или водяным паром в течение 15 – 30 мин или более в зависимости от твердости объекта.

Можно также использовать 2-й способ размачивания перед получением поперечных срезов, описанный в разделе «Листья», помещая при этом анализируемые объекты в воду на 1 сут, далее в смесь глицерин – вода – этанол (1:1:1) на 3 сут.

Мелкие плоды и семена запаивают в парафиновый блок размером 0,5×0,5×1,5 см. Кончиком нагретой препаровальной иглы расплавляют парафин и в образовавшуюся ямку быстро погружают объект. Поверхность объекта должна быть сухой. Срезы объекта делают вместе с парафином; срезы выбирают из парафина препаровальной иглой, смоченной жидкостью, и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %.

Для изготовления срезов из мелких плодов и семян можно также использовать пробку бузины или бутылочную пробку. Техника приготовления срезов описана в разделе «Листья». Необходимо при этом в используемых половинках пробки делать углубления, соответствующие

размерам плодов и семян.

Измельченное сырье. Выбирают крупные кусочки плодов и семян. Получают препараты аналогично препаратам цельного сырья. Более удобно проводить анализ в давленных препаратах, для чего просветленные объекты раздавливают обратным концом препаровальной иглы или скальпелем на предметном стекле в заключающей жидкости.

Из более крупных кусочков при необходимости готовят поперечные срезы, заливая анализируемые объекты в парафиновый блок или используя пробку бузины или бутылочную пробку.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев.

При исследовании строения клеток кожуры и околоплодника в порошке из плодов и семян, содержащих крахмал или незначительное количество жирного масла, препарат готовят в растворе хлоралгидрата при легком подогреве. При необходимости порошок обезжиривают и просветляют.

Для обезжиривания порошок сырья помещают в пробирку с притертой пробкой и заливают 2 – 3 раза смесью спирта с эфиром (1:3) и после настаивания каждый раз в течение 20 мин растворитель сливают. Вместо смеси спирта с эфиром для обезжиривания можно использовать ксилол или эфир.

Для просветления 0,5 – 1 г порошка насыпают в фарфоровую чашку, прибавляют 5 – 10 мл азотной кислоты разведенной 16 % и кипятят в течение 1 мин, затем жидкость процеживают через ткань и порошок промывают горячей водой. Остаток на ткани собирают лопаточкой обратно в фарфоровую чашку, обливают 5 – 10 мл натрия гидроксида раствора 5 %, кипятят в течение 1 мин, снова процеживают через ту же ткань и промывают горячей водой. После этого порошок рассматривают в глицерина растворе 33 % под микроскопом.

Крахмал

1. Цельные плоды или кусочки плодов, размоченные по второму способу, или полученные срезы, или порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном заключающей жидкостью, помещают в 2 – 3 капли воды или глицерина раствора 33 % на предметном стекле и рассматривают крахмальные зерна. Из цельного, измельченного и дробленого сырья делают давленные препараты. При изучении крахмальных зерен определяют их форму, строение, размеры измеряют окулярным микрометром.

2. Цельные плоды или кусочки плодов, размоченные по второму способу, или полученные срезы, или порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном реактивом, помещают в 2 – 3 капли раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и наблюдают крахмальные зерна. Из цельного, измельченного и дробленого сырья готовят давленные препараты, в которых рассматривают крахмал. Крахмальные зерна приобретают синее или сине-фиолетовое окрашивание. Необходимо учитывать, что окраска исчезает при нагревании. Приготовленный препарат следует анализировать сразу после его приготовления, так как окраска сохраняется недолго.

Жирное и эфирное масло

1. Эфирные масла наблюдаются без применения красителей в виде капель светло-желтого, темно-желтого, зеленовато-желтого, коричневатого-красного цвета.

2. Жирные и эфирные масла обнаруживают по реакции окрашивания с раствором Судана III. Для чего цельные плоды, кусочки плодов, готовые срезы или порошок на кончике препаровальной иглы, смоченном реактивом, помещают в 2 – 3 капли раствора Судана III, накрывают покровным стеклом и нагревают. Из цельного, измельченного и дробленого сырья готовят давленные препараты в используемом реактиве. Капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево-розовый или оранжево-желтый цвет.

3. Для отличия эфирных масел от жирных масел объекты погружают в 2 – 3 капли раствора метиленового синего. Через несколько минут их рассматривают в воде или глицерине. Эфирное масло окрашивается в синий цвет.

Слизь. Цельные и измельченные плоды измельчают в порошок. Для обнаружения слизи готовят препарат порошка в растворе черной туши, для чего порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном в используемом реактиве, помещают в 2 – 3 капли раствора черной туши, тщательно перемешивают, накрывают покровным стеклом и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на черном фоне.

Кора

Цельное сырье. Готовят поперечные или продольные срезы коры. Кусочки коры размером (2 – 3) см × (0,5 – 1) см кипятят в колбе или пробирке с водой в течение 5 мин. Размягченные куски выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %. При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Измельченное сырье. Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3 – 5 мин в натрия гидроксида растворе 5 %, промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %.

Одревесневшие элементы определяют по реакции, описанной для цельной коры.

Наличие крахмала, дубильных веществ, производных антрацена определяют в соскобе сухой коры.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов аналогично микропрепаратам порошка листьев для выявления анатомо-диагностических признаков коры и содержащихся в ней веществ по методикам, описанным

ниже.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. К срезу на предметном стекле прибавляют несколько капель раствора флороглюцина и 1 каплю серной кислоты раствора 25 %. Через 1 мин жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги, срез заключают в раствор хлоралгидрата или глицерина и закрывают покровным стеклом (рассматривают без подогревания); одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Для окраски одревесневших элементов можно использовать также раствор сафранина. Срезы помещают в сафранина раствор на 30 мин (в закрытом бюксе или на часовом стекле), промывают сначала спиртом этиловым 50 %, затем подкисленным спиртом этиловым (на 100 мл спирта этилового прибавляют 2 капли хлористоводородной кислоты концентрированной) и заключают на предметном стекле в глицерин. Одревесневшие оболочки окрашиваются в красный цвет.

Крахмал. Для обнаружения крахмала делают соскоб сухой коры и рассматривают его в растворе Люголя. Крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет.

Дубильные вещества. Наличие дубильных веществ устанавливают, нанося 1 каплю железа(III) аммония сульфата раствора 1 % (раствора квасцов железоаммониевых) или железа(III) хлорида раствора 3 % на внутреннюю поверхность сухой коры; появляется черно-синее или черно-зеленое окрашивание.

Производные антрацена. Наличие производных антрацена определяют, нанося 1 – 2 капли натрия гидроксида раствора 10 % на внутреннюю поверхность коры (кроваво-красное окрашивание), или проводят микросублимацию описанным ниже способом.

Почки

Цельное сырье. Готовят препараты с поверхности из цельных почек, а также поперечных и продольных срезов.

Микропрепараты готовят из цельных почек, рассматривая их с поверхности на поперечных и продольных срезах. Поперечные срезы следует делать в средней, т.е. медиальной части почки, определяя место среза по длине почки. При необходимости выполняют поперечный срез в базальной части почки и/или радиальное продольное сечение.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят на поперечных и продольных срезах, препаратах с поверхности кроющих чешуй с целью обнаружения кутикулы, эфирного масла, слизи, смолистых веществ, лигнифицированных оболочек клеток.

Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы

Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы. Небольшие куски подземных органов помещают в холодную воду и выдерживают около 1 сут, затем помещают в смесь этилового спирта 95 % и глицерина (1:1) на 3 сут. Размоченные объекты выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина в растворе 33 % и рассматривают анатомо-диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

С соскобом сухих подземных органов проводят необходимые микрохимические реакции, описанные ниже.

Измельченное сырье. Кусочки подземных органов кипятят в течение 3 – 5 мин в натрия гидроксида растворе 5 %, тщательно промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая кусочки в глицерина растворе 33 % или растворе хлоралгидрата.

С соскобом или порошком подземных органов проводят необходимые микрохимические реакции, описанные ниже.

Порошок. Микропрепараты порошка готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев. Для выявления содержащихся действующих веществ готовят препараты по методикам, описанным ниже.

Инулин. Для обнаружения инулина на предметное стекло помещают

около 0,1 г порошка (соскоба), 1 – 2 капли α -нафтола спиртового раствора 20 % (или резорцина раствора, или тимола спиртового раствора 20 %) и 1 каплю серной кислоты концентрированной; появляется красновато-фиолетовое окрашивание (от резорцина и тимола – оранжево-красное). О наличии инулина можно делать выводы только при отсутствии крахмала.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ, производных антрацена определяют, как указано в разделах «Плоды и семена» и «Кора».

Количественная характеристика анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья

Используется при описании конкретных анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья/препаратов, впервые вводимых в практику медицинского применения в процессе разработки на него фармакопейных статей или нормативной документации, а также при проведении анализа лекарственного растительного сырья/препаратов по разделу «Микроскопия», в тех случаях, когда указаны размеры анатомо-диагностических признаков и частота их встречаемости. Особенно важна количественная характеристика анатомо-диагностических признаков при анализе лекарственного растительного сырья/препаратов с целью его отличия от других родственных видов, которые нередко имеют похожие анатомо-диагностические признаки, но имеют другие количественные характеристики.

Определение размеров анатомо-диагностических признаков. Для снятия размеров анатомо-диагностических признаков пользуются объект-микрометром и окуляр-микрометром. Единицей для измерения микроскопических объектов служит микрометр (мкм), ранее использовался микрон (μ), составляющие одну тысячную долю миллиметра. Окуляр-микрометр вкладывается в окуляр, его шкала может быть различной в зависимости от объектива. Объект-микрометр имеет шкалу размером 1 мм, разделенную на 100 частей, то есть одно деление равно 0,01 мм или 10 мкм.

Объект-микрометр ставят на столик микроскопа, а шкалу ставят так, чтобы она совпала со шкалой окуляр-микрометра. Определив значение одного деления окуляр-микрометра, снимают объект-микрометр и при том же объективе измеряют требуемый объект.

Пример 1. При совмещении шкал окуляр- и объект-микрометров обнаружено, что 50 делений окуляр-микрометра совпадает с 10 делениями объект-микрометра.

$$50 \text{ делений окуляр-микрометра} = 10 \text{ делений объект-микрометра} \times 10 \text{ мкм} = 100 \text{ мкм}$$

Цена деления окуляр-микрометра составляет:

$$1 \text{ деление окуляр-микрометра} = \frac{100 \text{ мкм}}{50} = 2 \text{ мкм}$$

При измерении простого волоска установлено, что его высота составляет 10 делений окуляр-микрометра. Реальный размер этого волоска составит: $10 \cdot 2 \text{ мкм} = 20 \text{ мкм}$.

Пример 2. 40 делений окуляр-микрометра точно совпадают с 9 делениями объект-микрометра. Цена деления окуляр-микрометра соответствует:

$$1 \text{ деление окуляр-микрометра} = \frac{9 \cdot 10 \text{ мкм}}{40} = 2 \text{ мкм}$$

При измерении диаметра эфи́ро-масличной железки установлено, что он составил 5 делений окуляр-микрометра. Реальный размер эфи́ро-масличной железки соответствует: $5 \cdot 2 \text{ мкм} = 10 \text{ мкм}$.

Определение частоты встречаемости анатомо-диагностических признаков на единицу площади (1 мм^2) органа, ткани (эпидермиса). Для определения частоты встречаемости сначала необходимо вычислить площадь поля зрения микроскопа (при той же комбинации объектива и окуляров, при которой будет проводиться подсчет) по формуле:

$$S = \pi r^2,$$

где S – площадь поля зрения микроскопа, мм^2 ;
 r – радиус поля зрения микроскопа, мм;

d – диаметр поля зрения микроскопа, мм;
 $\pi = 3,1416$.

Диаметр (d) поля зрения микроскопа измеряется объект-микрометром. Зная цену деления объект-микрометра (см. маркировку на пластинке объект-микрометра), легко вычислить диаметр поля зрения микроскопа. Затем подсчитывают количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) в поле зрения микроскопа (при условии, что изучаемая ткань или орган занимают все поле зрения микроскопа). Количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) на единицу площади в 1 мм^2 определяют по формуле:

$$N = n \cdot 1 (\text{мм}^2)/S,$$

где N – количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) на единицу площади в 1 мм^2 ;

n – количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) в поле зрения микроскопа;

S – площадь поля зрения микроскопа, мм^2 .

Отношение $1 (\text{мм}^2)/S$ является постоянным коэффициентом для данной оптики, на который можно умножать подсчитанное количество структурных элементов в поле зрения, не составляя каждый раз уравнения.

Пример. $d = 420 \text{ мкм} = 0,42 \text{ мм}$; $r = 210 \text{ мкм} = 0,21 \text{ мм}$;

$$r^2 = 0,0441 \text{ мм}^2; S = 3,1416 \cdot 0,0441 = 0,138 \text{ мм}^2.$$

В поле зрения подсчитано 52 устьица. Количество устьиц (N) на площадь 1 мм^2 вычисляют:

$$N = 52 \cdot 1/0,138 = 52 \cdot 7,25 = 373.$$

Таким образом, на площадь эпидермиса листа в 1 мм^2 приходится 373 устьица. 7,26 – постоянный коэффициент для данной оптики.

Измерение толщины объекта (лепестков и чашелистиков)

При измерении толщины пользуются микрометрическим винтом микроскопа. Сначала наводят на резкость верхнюю поверхность измеряемого объекта, а затем нижнюю. Отмечают разность в обоих положениях

микровинта по делениям, которые на нем имеются. Эти деления обычно соответствуют микрометрам. При применении иммерсионных объективов эта разность равна толщине объекта, при объективах сухих систем ее надо умножить на 1,5, т.е. на соотношение между показателями преломления стекла и воздуха.

Люминесцентная микроскопия

Метод люминесцентной микроскопии применяется (когда это целесообразно) для определения подлинности лекарственного растительного сырья. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала, из которого готовят толстые срезы или микропрепараты порошка, и рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак-иллюминатор или объектив.

Люминесцентная микроскопия выполняется с помощью люминесцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминесцентными осветителями.

Приготовление микропрепаратов. Для приготовления микропрепаратов используют высушенное лекарственное растительное сырье или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Листья. Готовят обычно микропрепараты из порошка листьев, которые рассматривают без включающей жидкости. Наиболее яркая люминесценция характерна для одревесневших элементов – сосудов жилки, механических волокон, а также для кутикулы и кутинизированных оболочек различных эпидермальных образований (волосков, железок и др.). В эпидермальных клетках часто содержатся флавоноиды, обуславливающие коричневую, желтую или зеленовато-желтую люминесценцию. Клетки мезофила содержат различные включения – желтые, голубые, зеленовато-желтые, коричневые – в зависимости от их химического состава. Хлорофилл в высушенном растительном материале не люминесцирует. Кристаллы

оксалата кальция также не обладают люминесценцией.

При необходимости приготовления среза лист предварительно размягчают во влажной камере и с помощью бритвы делают толстый срез (2-3 мм), который закрепляют на предметном стекле пластилином. Более тонкие срезы помещают во включающую жидкость и накрывают покровным стеклом.

В качестве включающей жидкости используют воду, глицерин, поливинилового спирта раствор 5 %, нефлуоресцирующее вазелиновое масло.

Включающая жидкость не должна растворять содержащиеся в препарате люминесцирующие вещества.

Травы. При анализе трав готовят микропрепараты листьев. При необходимости приготовления препарата стебля его размягчают во влажной камере и готовят срезы. Толстые срезы (2 – 3 мм) закрепляют на предметном стекле с помощью пластилина и рассматривают без включающей жидкости, тонкие – помещают в подходящую жидкость и накрывают покровным стеклом. Наиболее яркую люминесценцию имеют одревесневшие элементы проводящих пучков – сосуды и механические волокна, склеренхимные клетки, встречающиеся в коре и сердцевине стебля. В клетках эпидермиса и коры часто встречаются флавоноиды; у некоторых видов сырья в клетках обкладки, вокруг проводящих пучков, содержатся алкалоиды, которые обладают разнообразным свечением: синим, голубым, зеленым, зеленовато-желтым, золотисто-желтым, оранжево-красным в зависимости от состава.

Цветки. Чаще готовят микропрепараты из порошка цветков или отдельных частей цветка (соцветия), которые рассматривают обычно без включающей жидкости. В цветках часто содержатся флавоноиды, каротиноиды и другие вещества, имеющие флуоресценцию. Отчетливо видны пыльцевые зерна, имеющие желтое, зеленовато-желтое или голубоватое свечение.

Плоды. Готовят обычно поперечные срезы плода после

предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Для плодов характерна люминесценция тканей околоплодника (экзокарпия, механических клеток мезокарпия, проводящих пучков). Отчетливо видны секреторные каналы – ярко светится их содержимое; клетки выстилающего слоя обычно имеют желтовато-коричневую люминесценцию. В содержимом каналов нередко видны ярко люминесцирующие кристаллические включения, чаще всего желтого или желто-зеленого цвета.

Семена. Готовят обычно поперечные срезы семени после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают их во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Обращают внимание на характер люминесценции семенной кожуры, в которой отчетливо выделяются склеренхимные слои. Клетки эпидермиса, содержащие слизь, обычно имеют сине-голубое свечение. Эндосперм и ткани зародыша, богатые жирным маслом, характеризуются голубой люминесценцией.

Кора. Кору предварительно размягчают во влажной камере, готовят толстые поперечные срезы (до 3 – 5 мм), которые закрепляют на предметном стекле пластином, и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы заключают в жидкость. Для некоторых видов сырья характерна люминесценция пробкового слоя коры: оболочки клеток пробки светятся интенсивно синим, их содержимое – темно-красным (антоцианы). Яркое и разнообразное свечение имеют механические элементы (лубяные волокна и каменистые клетки): голубое, зеленовато-голубое, желтовато-зеленое. Люминесценция паренхимы коры зависит от химического состава. Антрацен-производные обуславливают яркое оранжевое или огненно-оранжевое свечение. Дубильные вещества обладают свойством «тушить» люминесценцию, поэтому ткани, содержащие дубильные вещества, темно-коричневого, почти черного цвета.

Препарат, приготовленный из порошка коры или соскоба,

рассматривают без включающей жидкости. В нем наиболее ярко видны механические элементы.

Почки. Микропрепараты готовят из цельных почек, рассматривая их с поверхности на поперечных и продольных срезах. Поперечные срезы следует делать в средней, т.е. медиальной части почки, определяя место среза по длине почки. При необходимости выполняют поперечный срез в базальной части почки и/или радиальное продольное сечение.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят на поперечных и продольных срезах, препаратах поверхности кроющих чешуй с целью обнаружения кутикулы, эфирного масла, слизи, смолистых веществ, лигнифицированных оболочек клеток.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы. Готовят поперечные срезы, распилы, микропрепараты порошка или соскоба. Срезы готовят из материала, предварительно размягченного во влажной камере, распилы (из толстых корней и корневищ) – из сухого материала с помощью тонкой пилы или фрезы. С помощью бритвы с поверхности распила снимают тонкий слой для удаления слоя клеток, покрытых пылью. Толстые срезы и распилы (до 3 – 5 мм) закрепляют на предметном стекле пластилином и рассматривают без включающей жидкости. Слой пробки у подземных органов обычно тусклый, почти черный. Ярко люминесцируют древесина (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение очень разнообразно: от буровато-зеленого, желто-зеленого до светло-голубого и интенсивно синего в зависимости от вида сырья. Еще более разнообразна люминесценция паренхимы тканей и различных секреторных образований (вместилищ, каналов, ходов, млечников, различных идиобластов), что определяется их химическим составом. В секреторных образованиях встречаются кристаллические включения кумаринов, алкалоидов, флавоноидов, обладающие яркой люминесценцией.

В микропрепаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные

образования или их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.

Микропрепараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Определение подлинности,
измельченности и содержания
примесей в лекарственном
растительном сырье и
лекарственных растительных
препаратах**

ОФС.1.5.3.0004.15

Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает единые требования к определению подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Термины и определения

Подлинность лекарственного растительного сырья/препарата – это соответствие сырья/препарата тому наименованию, под которым оно поступило на анализ.

Измельченность лекарственного растительного сырья/препарата – показатель качества лекарственного растительного сырья/препарата (цельного, измельченного, порошка), который характеризует количество лекарственного растительного сырья/препарата, имеющего больший или меньший размер частиц в сравнении с установленным фармакопейной статьей для соответствующего вида лекарственного растительного сырья или препарата, и выражается в процентах.

Содержание примесей – показатель качества лекарственного растительного сырья/препарата (цельного, измельченного, порошка), характеризующий содержание в сырье/препарате допустимых примесей, попавших в сырье в процессе его заготовки, и выражающийся в процентах.

Общие положения

Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят в одной из 3 аналитических проб, полученной из средней пробы методом квартования в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Определение подлинности

Подлинность сырья устанавливают по внешним признакам, анатомо-диагностическим признакам при микроскопическом исследовании и качественным реакциям, хроматографическим и спектральным характеристикам и иными методами в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на лекарственное растительное сырье или препарат.

Методы определения подлинности лекарственного растительного сырья различных морфологических групп приведены в соответствующих ОФС («Листья», «Травы», «Кора», «Корни, корневища, луковичы, клубни, клубнелуковичы», «Цветки», «Плоды», «Семена», «Почки»).

Определение измельченности

Измельченность лекарственного растительного сырья/препарата определяют методом ситового анализа.

Для цельного лекарственного растительного сырья/препарата, как правило, приводят нормируемое значение частиц меньшего размера, определяемое с помощью сита. Размер отверстий сита и допустимая норма содержания частиц меньшего размера указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат.

В зависимости от морфологических особенностей, структуры и размеров цельного лекарственного растительного сырья для его просеивания используют сита с размером отверстий 3, 2, 1 и 0,5 мм.

Для измельченного лекарственного растительного сырья и порошка в

фармакопейной статье или нормативной документации приводятся допустимые значения содержания частиц большего и меньшего размера, определяемые с помощью 2 сит, размер отверстий которых указан в фармакопейной статье или нормативной документации на анализируемый вид лекарственного растительного сырья.

В зависимости от морфологической группы измельченное лекарственное растительное сырье, как правило, имеет размер частиц не более 7, 5 или 3 мм. Для просеивания измельченного сырья, как правило, используют верхние сита с размером отверстий 7, 5 или 3 мм и нижнее сито с размером отверстий 0,5 мм. В ряде случаев, когда высушенное лекарственное растительное сырье/препарат имеет хрупкую структуру, размер отверстий нижнего сита составляет 0,18 мм (ромашки цветки, мяты перечной листья, донника трава и др.).

Порошок – это, как правило, лекарственное растительное сырье, измельченное до частиц размером не более 2 мм. Для просеивания порошка, как правило, используют верхнее сито с размером отверстий 2 мм и нижнее сито с размером отверстий 0,18 мм.

Для цельного сырья количество частиц, проходящих сквозь сито с указанным размером отверстий, не должно превышать 5 %, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для измельченного сырья и порошка количество частиц, не проходящих сквозь верхнее сито с указанным размером отверстий, не должно превышать 5 %; количество частиц, проходящих сквозь нижнее сито с указанным размером отверстий, не должно превышать 5 %, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Методика определения измельченности

Часть аналитической пробы лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата помещают на сито, указанное в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат, и осторожно, плавными

вращательными движениями просеивают, не допуская дополнительного измельчения. Просеивание измельченных частей считается законченным, если количество сырья/препарата, прошедшего сквозь сито при дополнительном просеве в течение 1 мин, составляет менее 1 % сырья/препарата, оставшегося на сите.

Для цельного сырья частицы, прошедшие сквозь сито, взвешивают и вычисляют их процентное содержание к массе аналитической навески.

Для просеивания измельченного лекарственного растительного сырья/препарата и порошка берут 2 сита. Часть аналитической пробы сырья/препарата помещают на верхнее сито и просеивают. Затем отдельно взвешивают сырье/препарат, оставшееся на верхнем сите и прошедшее сквозь нижнее сито, и вычисляют процентное содержание частиц, не прошедших сквозь верхнее сито, и содержание частиц, прошедших сквозь нижнее сито, к массе аналитической навески. Взвешивание проводят с погрешностью $\pm 0,1$ г при массе аналитической навески свыше 100 г и $\pm 0,05$ г при массе аналитической навески 100 г и менее.

Допустимая норма содержания измельченных частиц для каждого вида лекарственного растительного сырья/препарата должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации.

Определение содержания примесей

Обычно к допустимым примесям лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов относят:

- части сырья, изменившие окраску, присущую данному виду лекарственного растительного сырья/препарата (побуревшие, почерневшие, выцветшие и т. д.);
- другие части растения, не соответствующие установленному описанию сырья;
- органическую примесь (части других неядовитых растений);
- минеральную примесь (земля, песок, камешки).

К недопустимым примесям относят стекло, помет грызунов и птиц,

части ядовитых растений, части растений, утратившие свою окраску (с указанием в фармакопейной статье или нормативной документации их недопустимой окраски).

Часть аналитической пробы цельного и измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, оставшуюся после определения подлинности и измельченности, взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г, затем помещают на чистую гладкую поверхность и лопаточкой или пинцетом выделяют примеси, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье или лекарственный растительный препарат.

Для порошка, как правило, определяют только минеральную примесь, так как определение других допустимых примесей затруднено.

Одновременно обращают внимание на наличие вредителей запасов в соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Каждый вид примеси взвешивают отдельно с погрешностью $\pm 0,1$ г при массе аналитической навески более 100 г и погрешностью $\pm 0,05$ г при массе аналитической навески 100 г и менее.

Содержание каждого вида примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2} \quad (1)$$

где m_1 – масса примеси, г;

m_2 – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г.

Для допустимых примесей устанавливаются следующие нормы: органическая примесь должна составлять не более 1 %; минеральная примесь – не более 1 %; части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду сырья, – не более 3 %; другие части растения, не соответствующие установленному описанию сырья, – не более 2 %, если

иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для определения содержания минеральной примеси, имеющей размеры менее 2 мм, анализируемую пробу цельного и измельченного лекарственного растительного сырья/препарата просеивают сквозь сито с размером отверстий 2 мм.

Частицы, прошедшие сквозь сито, помещают в стеклянный стакан вместимостью 1000 мл и далее используют метод определения содержания минеральной примеси в порошке.

Массу минеральной примеси, полученную в отсеке, присоединяют к массе минеральной примеси, отобранной механическим способом с помощью пинцета, и рассчитывают её суммарное содержание по формуле (1).

Для определения содержания минеральной примеси в порошке лекарственного растительного сырья/препарата часть аналитической пробы взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г, затем помещают в стеклянный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляют 200 мл воды. Чтобы устранить комочки из слипшихся частиц, содержимое размешивают до полного смачивания сырья /препарата, равномерно распределяя в объёме раствора. Выдерживают 3 – 5 мин. После оседания минеральной примеси воду со взвешенными частицами быстро (не давая разбухнуть частицам сырья) сливают с осадка. Осадок в стакане несколько раз промывают водой до полного удаления взвешенных частиц сырья.

По окончании промывания в стакане должен остаться осадок минеральной примеси с минимальным количеством воды. Стакан с осадком помещают в сушильный шкаф и сушат при температуре около 100 – 105 °C до приобретения осадком сыпучести. Высушенный осадок (минеральную примесь) охлаждают и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Содержание минеральной примеси рассчитывают по формуле (1).

**Зола, нерастворимая в
хлористоводородной кислоте**

**ОФС.1.5.3.0005.15
Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 2**

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, представляет собой остаток после обработки хлористоводородной кислотой золы общей и состоит преимущественно из кремнезёма.

В тигель, содержащий остаток после определения общей золы, прибавляют 25 мл хлористоводородной кислоты разведённой 10 %, тигель накрывают часовым стеклом и нагревают на кипящей водяной бане или электроплитке до закипания смеси и выдерживают в течение 10 мин. После охлаждения фильтруют содержимое тигля через беззольный фильтр, перенося на него осадок и обмывая часовое стекло горячей водой. Фильтр с осадком промывают горячей водой до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге, переносят его в тот же тигель, сушат и прокаливают при красном калении (550 – 650 °С), охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Прокаливание проводят до постоянной массы остатка.

Содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте 10 %, в сырье/препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m) \cdot 100}{m_2},$$

где m_1 – масса золы, г;
 m – масса золы фильтра, г (если золы последнего более 0,002 г);
 m_2 – масса сырья/препарата, г.

**Определение содержания
экстрактивных веществ в
лекарственном растительном
сырье и лекарственных
растительных препаратах**

ОФС.1.5.3.0006.15

Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты, которые в последующем используются для получения экстракционных лекарственных форм (настои, отвары, экстракты и т.д.), а также в случае отсутствия в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации метода количественного определения действующих биологически активных веществ.

Показатель «экстрактивные вещества» характеризует содержание в лекарственном растительном сырье/препарате всей суммы биологически активных и балластных веществ, извлекаемых экстрагентом. Тип экстрагента приводится в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат в зависимости от его последующего назначения.

Определение содержания экстрактивных веществ проводят гравиметрически одним из описанных ниже методов. Метод 1 используется для определения содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах, которые в последующем подвергаются процессу однократной экстракции. Метод 2 используется для определения содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных

препаратах, которые в последующем подвергаются многократной обработке одним и тем же экстрагентом. Метод 3 используется для определения содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах, которые в последующем подвергаются последовательной обработке различными экстрагентами. При отсутствии соответствующих указаний в фармакопейной статье или нормативной документации используют метод 1.

Метод 1. Однократная экстракция

Около 1 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью $\pm 0,01$ г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой и взвешивают. Потерю в массе содержимого колбы восполняют тем же растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150 – 200 мл. 25,0 мл полученного фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7 – 9 см и выпаривают содержимое на водяной бане досуха. Чашку с сухим остатком сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится кальция хлорид безводный, и немедленно взвешивают.

Содержание экстрактивных веществ в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{a \cdot (100 - W) \cdot 25},$$

где m – масса сухого остатка, г;

a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;

V – объем экстрагента, используемый при однократной обработке лекарственного растительного сырья/препарата, мл,

W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %.

Примечание. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье/препарате, содержащем полисахариды, проводят методом холодного настаивания в соответствии с ОФС «Настои и отвары».

Метод 2. Многократная экстракция
(предполагает последовательную обработку сырья одним и тем же экстрагентом с последующим получением суммарного экстракта)

Около 1 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат, колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150 – 200 мл. Фильтр с навеской снова помещают в исходную колбу и повторяют эту процедуру в соответствии с количеством экстракций сырья, необходимым при получении экстракта (2-, 3- и более кратном), каждый раз прибавляя фильтрат в ту же колбу. 25,0 мл объединенного фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы в точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром

7 – 9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с сухим остатком сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится кальция хлорид безводный, и снова взвешивают.

Содержание экстрактивных веществ в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot (V \cdot n)}{a \cdot (100 - W) \cdot 25},$$

где m – масса сухого остатка, г;

a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;

W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %;

n – число экстракций;

V – объем экстрагента, используемый при однократной обработке лекарственного растительного сырья/препарата, мл.

Метод 3. Последовательная экстракция
(предполагает последовательную обработку сырья различными
экстрагентами с определением содержания экстрактивных веществ в
каждой фракции)

Около 1 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат, взвешивают и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения потерю в массе содержимого колбы восполняют тем же растворителем. Содержимое колбы взбалтывают и фильтруют через бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150 – 200 мл. Фильтр с навеской помещают в чистую колбу и воспроизводят процедуру с растворителем, указанным в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат, фильтруя каждый раз в новые колбы. Из каждой полученной фракции 25,0 мл фильтрата пипеткой переносят в отдельные фарфоровые

чашки и выпаривают извлечения на водяной бане досуха. Сухие остатки высушивают до постоянной массы и снова взвешивают.

Содержание экстрактивных веществ в каждой фракции в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{a \cdot (100 - W) \cdot 25},$$

где m – масса сухого остатка, г;

a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;

W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %;

V – объем экстрагента, используемый при однократной обработке лекарственного растительного сырья/препарата, мл.

**Определение влажности
лекарственного растительного
сырья и лекарственных
растительных препаратов**

ОФС.1.5.3.0007.15

Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырье (свежее и высушенное) и лекарственные растительные препараты. Под влажностью понимают потерю в массе при высушивании за счет удаления гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах при высушивании до постоянной массы или другим методом, описанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Аналитическую пробу высушенного лекарственного растительного сырья, предназначенную для определения влажности, предварительно измельчают любым подходящим способом до размера частиц не более 10 мм, в зависимости от морфологической группы лекарственного растительного сырья. Аналитическую пробу лекарственного растительного препарата или измельченного высушенного лекарственного растительного сырья перемешивают и берут две навески по 3 – 5 г, взвешенные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску высушенного лекарственного растительного сырья/препарата помещают в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный бюкс с крышкой и ставят в сушильный шкаф, нагретый до 100 – 105 °С. При этой же температуре осуществляют высушивание взятых навесок.

Высушивание лекарственного растительного сырья/препарата проводят в открытых бюксах вместе со снятыми крышками. При взвешивании бюксы должны быть закрыты. Первое взвешивание охлажденных в эксикаторе анализируемых образцов, представленных листьями, травами, цветками и порошком из лекарственного растительного сырья и препаратов, проводят через 2 ч; анализируемых образцов, представленных корнями, корневищами, корой, плодами, семенами и другими морфологическими группами лекарственного растительного сырья и препаратов, – через 3 ч.

При определении влажности в свежем лекарственном растительном сырье аналитическую пробу анализируемого растительного объекта, предназначенную для определения влажности, предварительно измельчают до размера частиц не более 10 мм, используя для этого соответствующее оборудование и приспособления (ножницы, мельницы различных типов, ступку и др.), что определяется морфологической группой лекарственного растительного сырья. Измельченную аналитическую пробу свежего лекарственного растительного сырья тщательно перемешивают и берут две навески по 3 – 5 г, взвешенные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску свежего лекарственного растительного сырья помещают в предварительно высушенный и взвешенный бюкс с крышкой и ставят в сушильный шкаф, нагретый до 130 – 135 °С. При этой же температуре осуществляют высушивание взятых навесок.

Высушивание свежего лекарственного растительного сырья проводят в открытых бюксах вместе со снятыми крышками. При взвешивании бюксы должны быть закрыты. Для свежего лекарственного растительного сырья, представленного листьями, травами, цветками и плодами, первое взвешивание охлажденных в эксикаторе анализируемых образцов проводят через 1 ч, анализируемых образцов, представленных другими более плотными по морфологической структуре видами сырья, – через 2 ч.

Высушивание лекарственного растительного сырья/лекарственного

растительного препарата проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последовательными взвешиваниями после 30 мин дополнительного высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает $\pm 0,01$ г. В этом случае имеется в виду влажность воздушно-сухого лекарственного растительного сырья/препарата.

При определении абсолютной влажности, значение которой используется в формулах расчета количества действующих веществ в высушенном лекарственном растительном сырье/препарате, определение проводят в навесках 1 – 2 г (точная навеска), взятых из аналитической пробы, предназначенной для количественного определения действующих веществ и золы, вышеописанным методом, но при разнице между взвешиваниями, не превышающей $\pm 0,0005$ г.

Влажность (W) лекарственного растительного сырья/препарата в процентах вычисляют по формуле:

$$W = \frac{(m - m_I) \cdot 100}{m},$$

где m – масса до высушивания, г;
 m_I – масса после высушивания, г.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое трех параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента. Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0,5 %.

Для высушенного лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов устанавливают верхний предел содержания влаги: не более...%. Для свежего лекарственного растительного сырья, как правило, нормируется нижний и верхний предел содержания влаги: не менее...% и не более...%.

Для определения влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов возможно использование влагомеров термографических инфракрасных, при этом в фармакопейной статье или

нормативной документации должны быть указаны навеска, измельченность лекарственного растительного сырья/препарата, а также режим сушки и норма влажности. Методика должна быть валидирована.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах	ОФС.1.5.3.0008.15
	Взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1

Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят титриметрическим и/или спектрофотометрическим методами. Титриметрический метод заключается в определении суммы дубильных веществ в пересчете на танин, а спектрофотометрический метод позволяет определять сумму дубильных веществ в пересчете на пирогаллол.

Метод 1. Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин

Около 2 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл так, чтобы частицы сырья/препарата не попали в колбу, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 25,0 мл полученного водного извлечения помещают в коническую колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании калия перманганата раствором 0,02 М до золотисто-желтого

окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт: в коническую колбу вместимостью 1000 мл помещают 525 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании калия перманганата раствором 0,02 М до золотисто-желтого окрашивания.

1 мл калия перманганата раствора 0,02 М соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где V – объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование водного извлечения, мл;

V_1 – объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл калия перманганата раствора 0,02 М (в пересчете на танин), г;

a – навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г;

W – влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %;

250 – общий объем водного извлечения, мл;

25 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Примечание. *Приготовление раствора индигосульфокислоты.* 1 г индигокармина растворяют в 25 мл серной кислоты концентрированной, затем прибавляют дополнительно 25 мл серной кислоты концентрированной и разбавляют водой до 1000 мл, осторожно вливая полученный раствор в воду, в мерной колбе вместимостью 1000 мл, перемешивают.

Метод 2. Определение суммы дубильных веществ в пересчете на пирогаллол

Около 0,5 – 1,0 г (точную навеску или иную, указанную в фармакопейной

статье или нормативной документации) измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл воды и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное водное извлечение в колбе охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл так, чтобы частицы сырья не попали в колбу, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр диаметром около 125 мм, отбрасывая первые 50 мл фильтрата.

Определение проводят в защищенном от света месте.

Определение суммы дубильных веществ. 5,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива, 10 мл воды и доводят объем раствора до метки натрия карбоната раствором 10,6 % (испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора (A_1) на спектрофотометре при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Определение суммы дубильных веществ, не адсорбируемых кожным порошком. К 10,0 мл фильтрата прибавляют 0,1 г кожного порошка, перемешивают полученную смесь в течение 60 мин и фильтруют через бумажный фильтр. 5,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива, 10 мл воды, объем раствора доводят до метки натрия карбоната раствором 10,6 % и

перемешивают (испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора (A_2) на спектрофотометре при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора.

2,0 мл раствора СО пирогаллола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива, 10 мл воды, доводят объем раствора до метки натрия карбоната раствором 10,6 % и перемешивают (стандартный раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность стандартного раствора (A_3) на спектрофотометре при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на пирогаллол в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{62,5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot a_0 \cdot 100}{A_3 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора при определении суммы дубильных веществ;

A_2 – оптическая плотность испытуемого раствора при определении суммы дубильных веществ, не адсорбируемых кожным порошком, в пересчете на пирогаллол;

A_3 – оптическая плотность стандартного раствора;

a – навеска лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, г;

a_0 – навеска СО пирогаллола, г;

W – влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %.

Примечание. Приготовление раствора СО пирогаллола. 0,05 г (точная навеска) СО пирогаллола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

ОФС.1.5.3.0009.15

Вводится впервые

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на методы количественного определения тяжелых металлов: свинца, кадмия, ртути и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят с использованием одного из следующих методов:

- атомно-абсорбционной спектрометрии;
- атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой;
- масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Результаты, полученные при определении содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье, распространяются на лекарственный растительный препарат, произведенный из данной партии лекарственного растительного сырья.

Лекарственные растительные препараты подвергаются выборочному контролю на содержание тяжелых металлов и мышьяка не реже одного раза в год (одна серия каждого наименования).

Процедура определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах состоит из следующих основных этапов:

1. Отбор пробы для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка. Отбор пробы проводится в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» в условиях, исключающих дополнительное загрязнение сырья.

2. Подготовка пробы.

3. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в испытуемых пробах.

4. Определение соответствия сырья допустимым нормам.

Оборудование, реактивы, растворы

Для определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах используют оборудование, отвечающее требованиям ОФС на соответствующие методы анализа.

При выполнении исследований используют реактивы, предназначенные для спектральных методов анализа или марки «ос.ч.».

Приготовление растворов осуществляют в мерной посуде класса А или 1 класса точности, а их хранение – в пластиковой посуде (PMP, PFA, PP).

Используемая вода должна быть деионизованной (деионизированной) на ионнообменных смолах и соответствовать требованиям, предъявляемым к воде очищенной.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЫШЬЯКА МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Аппаратура для метода атомно-абсорбционной спектроскопии

Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят на атомно-абсорбционном спектрометре с различными атомизаторами пробы (пламенный, электротермический), а также методом «холодного пара» и генерации гидридов.

Подготовка лабораторной посуды включает следующие

последовательные этапы: обычная мойка посуды с раствором моющего средства, тщательное ополаскивание проточной водой питьевой, затем замачивание в натрия гидроксида растворе 1 % и водорода пероксиде, ополаскивание проточной водой питьевой с последующим замачиванием в течение 1 ч в хлористоводородной кислоты растворе 10 %, либо обработка посуды азотной кислоты раствором 1 %, ополаскивание водой для хроматографии 3-4 раза, сушка.

Приготовление стандартных растворов тяжелых металлов и мышьяка осуществляют в лабораторных условиях или используют готовые растворы стандартных образцов.

Подготовка проб к анализу

Пробоподготовка включает в себя предварительное измельчение пробы для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка с целью приготовления однородного образца и последующего взятия не менее двух параллельных навесок, деструкцию органической матрицы для перевода ионов металлов и мышьяка в раствор.

При отборе проб следует избегать контакта лекарственного растительного сырья и препаратов с предметами, содержащими определяемые металлы. Загрязнение лабораторной посуды железом, хромом и никелем может происходить при контакте с нержавеющей сталью, свинцом – с резиной, кадмием – с некоторыми видами пластмасс. Эти загрязнения контрольным опытом не учитываются и могут давать заметное завышение результатов.

Пробу сырья предварительно измельчают с помощью ножа или ножниц, затем в специальных лабораторных дробилках или мельницах-измельчителях и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм (ОФС «Оборудование»). Лекарственные растительные препараты, расфасованные в пачки, дополнительно измельчают и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм.

Лекарственные растительные препараты, расфасованные в фильтр-

пакеты, дополнительно измельчают и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм.

Для дальнейшей подготовки к анализу рекомендуется использовать два метода подготовки пробы:

- сухая минерализация;
- мокрая минерализация.

Пробоподготовка сырья и препаратов к анализу заключается в деструкции органической основы пробы методами «сухой» (термической) минерализации, «мокрой» (кислотной) минерализации с последующим растворением остатка в водных растворах кислот или кислотной экстракции (неполной минерализации). При недостаточной чувствительности проводят концентрирование токсичных элементов с последующим атомно-абсорбционным определением их в органических растворах.

Метод «сухой» минерализации основан на полном разложении органических веществ путем сжигания анализируемой пробы в муфельной печи при контролируемом температурном режиме.

Метод «мокрой» минерализации основан на полном разложении органических веществ пробы при нагревании в смеси концентрированных кислот. Проведение «мокрой» минерализации возможно в открытых системах (колбах Кьельдаля, стеклянных стаканах), либо в закрытых системах (например, автоклав, микроволновая система для пробоподготовки).

Метод пробоподготовки лекарственного растительного сырья и препаратов к анализу выбирают в соответствии с аппаратным оснащением аналитической лаборатории. Для арбитражного контроля используют метод «мокрой» минерализации (с использованием микроволновой системы для пробоподготовки). Параллельно проводят холостой опыт.

Метод 1а («сухая» минерализация, Pb, Cd)

Около 2,5 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в фарфоровый, стеклоуглеродный, кварцевый

или другой тигель и ставят в холодную муфельную печь. Озоление образцов проводят постепенно, поднимая температуру печи на 50°C каждые 30 мин (во избежание воспламенения) до 480°C, выдерживают в печи до полного озоления образца. После охлаждения пробу переносят во фторопластовый стакан, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной, свободной от свинца и кадмия, и оставляют на ночь. Затем нагревают пробу на электрической плитке и выпаривают до сухого остатка, после чего добавляют 1 мл фтористоводородной кислоты концентрированной и при сильном нагреве выпаривают досуха. Остаток охлаждают и обрабатывают 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной (1:1) и упаривают до «влажных солей». Остаток доводят хлористоводородной кислоты раствором 2,5 % до объема 10 мл.

Метод 1б («сухая» минерализация, Pb, Cd)

Около 0,5-1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в тигель (из стеклоуглерода марки С-200, разрешается использование кварцевых и платиновых тиглей, фарфоровых с неповрежденной внутренней поверхностью), смачивают 0,5-1,5 мл серной кислоты концентрированной и осторожно нагревают на пламени газовой горелки, электрической плитке и др. до полного обугливания. Затем тигель охлаждают до комнатной температуры и прибавляют к его содержимому 1 мл азотной кислоты концентрированной и 5 капель серной кислоты концентрированной. После этого осторожно нагревают на электрической плитке до исчезновения бурых паров, избегая разбрызгивания, потом усиливают нагрев до исчезновения плотных белых паров. Затем тигель помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре около 500 °С до получения зольного остатка. После чего тигель охлаждают до комнатной температуры и к его содержимому прибавляют 4 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М, закрывают крышкой и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем крышку снимают и осторожно упаривают содержимое тигля до «влажных солей», после чего прибавляют 1 каплю

хлористоводородной кислоты концентрированной и 5 мл горячей воды и нагревают в течение 2 мин. Полученный остаток количественно (трехкратно) переносят небольшими порциями при помощи воды для хроматографии в мерную колбу вместимостью 25 или 50 мл, фильтруя через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, и доводят водой для хроматографии до метки и перемешивают.

Метод 2а («мокрая» минерализация, Pb, Cd)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в колбу Кьельдаля вместимостью 100 мл, прибавляют 7 мл азотной кислоты концентрированной, перемешивают до полного смачивания пробы. После этого к содержимому прибавляют 4 мл хлорной кислоты концентрированной и перемешивают. Колбу закрепляют под углом 45° на песчаной бане, осторожно нагревают до появления бурых паров азота оксида и нагрев отключают. После полного прекращения выделения бурых паров температуру повышают до появления плотных белых паров и получения кислотного остатка 1-2 мл, колбу снимают с песчаной бани, охлаждают и количественно при помощи воды для хроматографии переносят ее содержимое в мерную колбу вместимостью 50 или 100 мл, фильтруя содержимое через беззольный фильтр (промытый хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Метод 2б («мокрая» минерализация, Hg)

Около 0,5 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в стеклянный стакан вместимостью 50 мл, смачивают водой, приливают 6 мл серной кислоты концентрированной и 3 мл азотной кислоты концентрированной. Перемешивают, стакан накрывают крышкой из стеклоуглерода и оставляют в водяной бане на 1 сут при температуре около 10-20 °С, затем переносят на водяную баню и нагревают при температуре 50-60 °С в течение 2 ч. После этого стакан охлаждают до комнатной температуры, снимают крышки из стеклоуглерода и прибавляют

5 мл аммония персульфата раствора 5 %. Смесь перемешивают и оставляют в стакане на ночь при комнатной температуре. На следующий день содержимое стакана переносят в мерную колбу вместимостью 200 или 250 мл и проводят дальнейшее определение.

Метод 2в («мокрая» минерализация, Hg)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают во фторопластовый стакан металлического тубуса, смачивают 6 мл смеси серной кислоты концентрированной и азотной кислоты концентрированной в соотношении 1:5. Стакан, закрытый фторопластовой крышкой, помещают в металлический тубус. Металлический тубус закрывают, помещают в сушильный шкаф, нагревают до 100 °С и выдерживают при этой температуре в течение 4 ч, далее его вынимают, охлаждают, вскрывают и количественно переносят содержимое фторопластового стакана в мерную колбу вместимостью 200 или 250 мл, и проводят определение.

Метод 2г («мокрая» минерализация, Pb, Cd, As)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают во фторопластовый стакан автоклава, смачивают 10 мл смеси хлористоводородной кислоты концентрированной и азотной кислоты концентрированной в соотношении 1:1. Стакан, закрытый фторопластовой крышкой, помещают в автоклав. Автоклав закрывают, помещают в сушильный шкаф, нагревают до 200 °С и выдерживают при этой температуре 2 ч. Далее автоклав вынимают, охлаждают, вскрывают и количественно переносят содержимое фторопластового стакана в мерную колбу вместимостью 50 мл, фильтруя содержимое через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Метод 2д («мокрая» минерализация, Pb, Cd, Hg, As)

Мокрые минерализацию проводят в системе микроволнового разложения. Разложение в микроволновой системе возможно в различном

аппаратурном исполнении при использовании различных кислот и реагентов. При использовании таких систем нужно придерживаться рекомендаций фирмы-изготовителя. Необходимо валидировать методику разложения лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

В качестве примера приводится следующая методика.

Около 0,5 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья/препарата помещают в сосуд для микроволнового разложения, приливают 3 мл воды и 5 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно перемешивают до полного смачивания и выдерживают в течение 5-10 мин. Сосуд герметично закрывают, помещают его в защитный кожух и затем в ротор микроволновой системы. Далее проводят обработку по программе, приведенной в табл. 1.

Таблица 1 – Программа обработки образцов лекарственного растительного сырья/препарата в системе микроволнового разложения

Этап	Время, мин	Температура, °С	Мощность излучения, Вт
1	5	80	до 350
2	3,5	160	до 800
3	4,5	190	до 1000
4	12	190	до 800

В конце цикла сосуды охлаждают на воздухе, открывают и полученный прозрачный или с небольшим осадком раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, фильтруя через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Допускается проведение пробоподготовки с использованием систем для минерализации проб (микроволновые, автоклавные и т.д.) с валидацией по образцам с известным содержанием элементов.

Проведение измерений

Измерения проводят различными вариантами метода атомно-

абсорбционной спектрометрии с разными способами атомизации пробы. Чувствительность измерения в атомно-абсорбционном анализе для пламенного метода составляет 0,01-10 мкг/мл, для непламенных – 0,0001-0,1 мкг/мл. Ртуть определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии с применением техники «холодных паров».

Анализ проб на содержание свинца и кадмия осуществляют пламенным вариантом (табл. 2), свинца, кадмия и мышьяка с использованием электротермического атомизатора (табл. 3); ртути – на ртутном анализаторе или с использованием ртутно-гидридной приставки к атомно-абсорбционному спектрометру, мышьяка – с использованием ртутно-гидридной приставки к атомно-абсорбционному спектрометру в соответствии с условиями анализа элементов (табл. 2).

Таблица 2 – Ориентировочные параметры определения тяжелых металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектрометрии (пламенный вариант)

Металл	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Тип пламени	Чувствительность, мкг/мл
Кадмий	228,8	0,3	В - А	0,025
Свинец	283,3	0,4	В - А	0,50
Ртуть	253,7	0,7	«холодный пар»	0,002
Мышьяк	193,7	0,5		0,002

Примечание: тип пламени: В - воздух, А – ацетилен в соответствии с требованиями инструкции по эксплуатации фирмы изготовителя.

Обработку полученного аналитического сигнала для ртути и мышьяка осуществляют по высоте пика.

Стадия высушивания зависит от кислотного, органического, минерального состава пробы и конструктивных особенностей прибора.

Обработку полученного аналитического сигнала для кадмия, свинца и мышьяка осуществляют по площади пика.

Параметры определения тяжелых металлов и мышьяка со стадиями высушивания, озоления (пиролиза), атомизации и отжига (очистки)

исследуемых проб обрабатываются для конкретных приборов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Таблица 3 – Ориентировочные параметры определения тяжелых металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии (электротермический вариант)

Металл	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Стадия озолнения (пиролиза)		Стадия атомизации		
			T, °C	t _{сек} , с	T, °C	t _{сек} , с	t _{инт} , с
Кадмий	228,8	0,20-0,5	300-600	8-25	1300-1700	3-5	3-5
Свинец	283,3	0,20-0,5	500-800	8-25	1600-2000	3-5	3-5
Мышьяк*	193,7	0,20-0,5	800-1400	8-15	2200-2600	3-5	3-5

Примечание: T, °C – температура озолнения, атомизации; t_{сек}, с – время озолнения, атомизации; t_{инт}, с – время интегрирования;

* при использовании корректора Зеемана

Для уменьшения влияния минерального состава лекарственного растительного сырья или препарата на исследуемые элементы используют:

1. Кювету с пластиной (платформой).
2. Модификаторы матрицы.
3. Разбавление анализируемого раствора.

Подготовку атомно-абсорбционного спектрометра к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора с учетом особенности измерения низких концентраций элементов.

Результатом измерений является величина атомного поглощения элемента, полученная в абсорбционном режиме с доверительной вероятностью $P=0,95$.

Обработка результатов измерений и определение соответствия тяжелых металлов в сырье допустимым нормам

Обработку результатов проводят с использованием компьютерных программ. При ручной обработке данных строят график зависимости абсорбции от концентрации. Допускается применять линейную, кусочно-линейную или сглаженную нелинейную аппроксимацию градуировочной функции с коэффициентом корреляции не менее 0,990. В расчетах используют среднее

арифметическое значение 3 параллельных измерений.

Результаты определения содержания тяжелых металлов в испытуемом образце (C) следует считать как среднее арифметическое 3 параллельных определений с точностью до 0,001 мкг.

Содержание металла в испытуемом лекарственном растительном сырье/препарате (X) в мкг/г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_X \cdot V}{a} - C_K \cdot V_K,$$

где C_X – концентрация металла в испытуемом растворе, мкг/мл;

V – разведение, мл;

C_K – концентрация металла в контрольном опыте, мкг/мл;

V_K – объем контрольной пробы, мл;

a – навеска сырья/препарата, г.

Методики определения тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах должны быть валидированы. Выбор методики измерения аналитического сигнала (по градуировочной кривой или методом «стандартных добавок») для конкретных объектов исследования определяется в ходе валидации методики.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СПОСОБЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

При проведении определения содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах методами атомно-абсорбционной спектроскопии; атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой; масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; рентгенофлуоресцентной спектроскопии могут быть использованы способы пробоподготовки и проведения результатов измерений, приведенные ниже.

Метод 1 (сухая минерализация)

Метод соответствует методу 1б («сухая» минерализация, Pb, Cd), приведенному в разделе «Подготовка проб к анализу» для атомно-

адсорбционной спектрометрии.

Метод 2 (мокрая минерализация)

Метод соответствует методу 2д («мокрая» минерализация, Pb, Cd, Hg, As), приведенному в разделе «Подготовка проб к анализу» для атомно-адсорбционной спектрометрии.

Проведение измерений

Определение содержания кадмия, ртути, мышьяка, свинца проводят методом калибровочной кривой. Для этого из стандартных образцов элементов с концентрацией 1000 мг/дм³ готовят серию градуировочных растворов, содержащих заявленные элементы в концентрациях:

Градуировочный раствор	Концентрация, мг/дм ³
№1	0,003
№2	0,01
№3	0,03
№4	1,0
№5	4,0
№6	10

Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления градуировочных растворов используют готовые растворы стандартных образцов (ГСО) состава ионов металлов отечественного или зарубежного производства (CRM) с концентрацией элементов 1000 мг/дм³ в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1%.

Измерения для каждого градуировочного раствора выполняют не менее 5 раз. С помощью программы обработки данных полученные результаты для каждого градуировочного раствора усредняют и строят линейную градуировочную характеристику (калибровочную кривую) зависимости выходного сигнала от концентрации определяемых элементов в градуировочном растворе (мг/дм³).

Градуировочная характеристика должна быть линейной во всем диапазоне измеряемых концентраций с коэффициентом корреляции не менее

0,990, который определяется автоматически, без вмешательства оператора.

По значению выходного сигнала испытуемого раствора с использованием градуировочной характеристики и программы обработки данных находят концентрацию определяемых элементов в анализируемом растворе (мг/дм³).

За результат измерений принимают среднее арифметическое 3 параллельных определений одной пробы.

Предельно допустимое содержание тяжелых металлов не должно превышать значений, приведенных в табл. 4.

Таблица 4 – Предельно допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Металл	Предельно допустимое содержание, мг/кг
Свинец	6,0
Кадмий	1,0
Ртуть	0,1
Мышьяк	0,5

Примечание – В соответствии с требованиями безопасности, принятыми в Российской Федерации.

**Определение содержания
эфирного масла в лекарственном
растительном сырье и лекарственных
растительных препаратах**

ОФС.1.5.3.0010.15

**Взамен ГФ X, ст. ГФ XI,
вып. 1**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты. Определение содержания эфирного масла проводят путем его перегонки с водяным паром из лекарственного растительного сырья или лекарственных растительных препаратов с последующим измерением объема. Содержание масла выражают в массо-объемных процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье или препарат.

Навеска сырья или препарата, степень его измельчения, метод и время перегонки должны быть указаны в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат.

Определение проводят одним из описанных ниже методов.

Метод 1 применим для определения эфирного масла в лекарственном растительном сырье/препарате, содержащем значительную массовую долю эфирного масла, или если имеется возможность отобрать для анализа достаточно большую навеску, однако этот метод не пригоден для анализа термолабильных эфирных масел.

Метод 2 применим для анализа термолабильных эфирных масел.

Содержание эфирного масла, которое при перегонке претерпевает изменения, образует эмульсию, легко загустевает или имеет плотность, равную единице или более единицы, определяют методом 3.

Приведенные ниже методы могут использоваться для определения содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Метод 1. Используют прибор, изображенный на рис. 1. Навеску измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в широкогорлую круглодонную колбу (4) вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл воды очищенной и закрывают резиновой пробкой (2) с обратным шариковым холодильником (1). В пробке снизу укрепляют металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивают предварительно заполненный водой очищенной градуированный приемник (3) так, чтобы конец холодильника находился над воронкообразным расширением приемника, не касаясь его. Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенок, и отстоять от уровня воды не менее чем на 50 мм. Цена деления градуированной части приемника 0,025 мл.

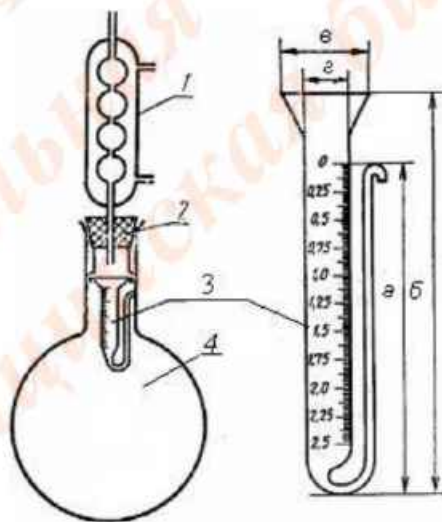


Рис. 1 – Прибор для определения эфирного масла методом 1

1 – обратный шариковый холодильник; 2 – резиновая пробка;
3 – приемник (размеры даны в миллиметрах): а – 55-80; б – 70-95; в – 18-21; с – 6-10;
4 – широкогорлая колба

Колбу с содержимым нагревают на электроплитке с закрытой

спиралью и регулятором мощности нагрева или при помощи специального колбонагревателя и кипятят в течение времени, указанного в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное растительное сырье/препарат.

За 5 мин до окончания отгонки прекращают подачу воды в холодильник с целью прогрева его для того, чтобы оставшиеся на его внутренних стенках капли эфирного масла стекли в приемник.

Объем эфирного масла в градуированной части приемника измеряют после окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры. После 6-8 определений холодильник и градуированный приемник необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Содержание эфирного масла в абсолютно сухом сырье в массо-объемных процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем эфирного масла, мл;
 a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;
 W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %.

Метод 2. Используют прибор, изображенный на рис. 2. Прибор для определения эфирного масла состоит из круглодонной колбы (1) вместимостью 1000 мл, паропроводной изогнутой трубки (2), холодильника (3), градуированной трубки-приемника (4), оканчивающейся внизу спускным краном (5) и сливной трубкой (9). В верхней части приемника имеется расширение (6) с боковой трубкой (7), которая служит для внесения растворителя эфирного масла в дистиллят и сообщения внутренней части прибора с атмосферой. Колба и паропроводная трубка соединяются через шлиф. Градуированная трубка имеет цену деления 0,02 мл. Заполнение прибора водой производится через спускной кран при помощи резинового шланга (8) с внутренним диаметром 4,5-5 мм, длиной 450 мм и с присоединенной к нему воронкой диаметром 30-40 мм.

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение

15-20 мин. После 6-8 определений прибор необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Навеску измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резинового шланга, оканчивающегося воронкой.

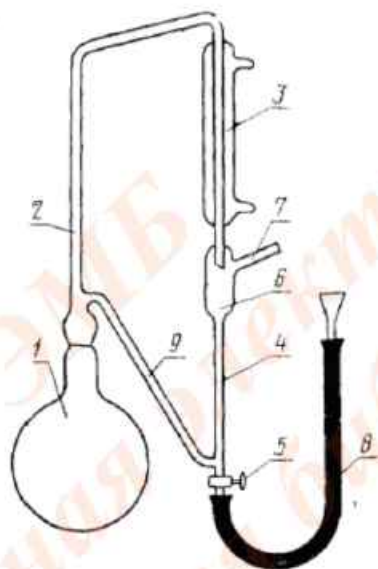


Рис. 2 – Прибор для определения эфирного масла методами 2 и 3

- 1 – колба; 2 – паропроводная изогнутая трубка; 3 – холодильник;
4 – градуированная трубка-приемник; 5 – спускной кран;
6 – расширение приемника; 7 – боковая трубка приемника;
8 – резиновый шланг; 9 – сливная трубка

Колбу с содержимым нагревают и кипятят с интенсивностью, при которой скорость стекания дистиллята составляет 60 – 65 капель в минуту в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки-приемника, и еще через 5 мин измеряют объем эфирного масла.

Содержание эфирного масла в абсолютно сухом сырье в массо-объемных процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем эфирного масла, мл;
 a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;
 W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %.

Метод 3. Для определения эфирного масла методом 3 используют прибор, изображенный на рис. 2. Навеску измельченного лекарственного растительного сырья/препарата, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через спускной кран при помощи резинового шланга, оканчивающегося воронкой. Затем через боковую трубку при помощи пипетки добавляют в приемник около 0,5 мл декалина и точно измеряют его объем, опуская для этого уровень жидкости в градуированную часть трубки. Далее поступают, как описано в методе 2.

Содержание эфирного масла в абсолютно сухом сырье в массо-объемных процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем раствора эфирного масла в декалине, мл;
 V_1 – объем декалина, мл;
 a – навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;
 W – влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %.

Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах	ОФС.1.5.3.0011.15 Вводится впервые
--	--

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырьё и лекарственные растительные препараты, независимо от формы выпуска, на этапах переработки лекарственного растительного сырья, при производстве лекарственных растительных препаратов, хранении, транспортировании, закупке, ввозе в страну, сертификации и реализации (далее обращение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов).

Содержание остаточных пестицидов, как правило, определяют в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах, получаемых от культивируемых лекарственных растений.

Термины и определения

В настоящей общей фармакопейной статье использованы следующие определения.

Пестициды – химические или биологические препараты, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений, сорными растениями, вредителями хранящейся сельскохозяйственной продукции, бытовыми вредителями и внешними паразитами животных, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев (дефолианты), предуборочного подсушивания растений (десиканты).

Остаточные пестициды – вещества, включающие в себя остаточное

количество пестицидов и любые производные пестицидов (продукты конверсий, реакций, метаболиты, примеси).

Проба для определения остаточных пестицидов и тяжелых металлов – определенное количество пробы, выделенной методом квартования из объединенной пробы.

Единицы измерения – мг/кг – количество мг пестицида в 1 кг лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата.

Средства измерений включают необходимые для определения содержания пестицидов приборы и методики выполнения измерений, имеющие нормированные метрологические характеристики.

Контроль на содержание остаточных количеств пестицидов – определение соответствия исследуемых объектов требованиям нормативной документации.

Общие положения

Для обеспечения достоверности полученных результатов анализируемое на содержание остаточных пестицидов лекарственное растительное сырье/препараты, как правило, должно иметь влажность не более 15 %.

В лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах определяют содержание остаточных пестицидов, в том числе хлорсодержащих: гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и его изомеров (α -, β -, γ -ГХЦГ), дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его метаболитов (ДДД – дихлордифенилдихлорметилметана, ДДЕ – дихлордифенилхлорэтилена), гексахлорбензол (ГХБ), алдрин, гептахлор и других.

Основные этапы определения содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах:

- отбор пробы для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка (ОФС «Отбор проб лекарственного растительного

сырья и лекарственных растительных препаратов»);

- подготовка пробы к определению;
- определение содержания остаточных пестицидов в испытуемых образцах;
- обработка результатов измерений;
- определение соответствия сырья допустимым нормам.

Пробы должны анализироваться немедленно, во избежание возможного разрушения остатков пестицидов. Если это невозможно, пробы сохраняют в герметичных контейнерах, пригодных для контакта с пищевыми продуктами, при температуре ниже 0 °С в защищенном от света месте.

Все реактивы и растворители не должны содержать примесей, особенно пестицидов, которые могут влиять на результаты анализа.

Используемые аналитические методы должны удовлетворять требованиям ОФС «Валидация аналитических методик» и следующим критериям:

- выбранный метод является подходящим для комбинации остаточный пестицид/лекарственное растительное сырье;
- при интерпретации результатов необходимо учитывать влияние некоторых компонентов (например, влияние дисульфида у растений семейства Крестоцветных);
- концентрации испытуемого раствора и раствора сравнения, а также настройки аппаратуры должны быть такими, чтобы аналитический сигнал, используемый для количественного анализа пестицидов, находился в пределах линейного диапазона используемого детектора;
- каждый пестицид извлекается в диапазоне 70-110 %;
- повторяемость и воспроизводимость метода: относительное стандартное отклонение (%) не должно превышать значений, указанных в табл. 1.

Для определения содержания пестицидов в пробе используется газовая (ГХ/МС) или жидкостная (ВЭЖХ/МС) хроматография с масс-

спектрометрическим детектором. При отсутствии масс-спектрометрического детектора можно использовать электронно-захватный или другие селективные детекторы. Определение проводится в соответствии с требованиями ОФС «Хроматография», «Газовая хроматография», «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и «Масс-спектрометрия».

Таблица 1 – Аналитические характеристические параметры в различных диапазонах концентрации вещества

Диапазон концентрации вещества, мг/кг	Повторяемость (относительное стандартное отклонение, %)	Воспроизводимость (относительное стандартное отклонение, %)
0,001-0,01	30	60
>0,01-0,1	20	40
>0,1-1	15	30
>1	10	20

Лекарственные растительные препараты получают из лекарственного растительного сырья, которое соответствует по содержанию остаточных пестицидов требованиям настоящей общей фармакопейной статьи. Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственных растительных препаратах проводят в случае обоснованных претензий.

Поставщик лекарственного растительного сырья должен предоставить протокол анализа на поставляемую партию лекарственного растительного сырья, в котором указываются использованные пестициды и содержание остаточных пестицидов.

Порядок отбора проб

Отбор проб от партии сырья/серии препарата проводят в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» и настоящей статьей.

Отбор проб для проведения испытаний осуществляют в соответствии с действующими санитарно-гигиеническими правилами и условиями,

исключающими дополнительное загрязнение сырья.

Определение остаточных пестицидов (хлорсодержащих)

Подготовка проб к анализу

Пробы лекарственного растительного сырья/препарата измельчают и просеивают через сито с размером отверстий 0,5 мм. Затем около 5 г сырья/препарата (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мкл стандартного раствора внутреннего стандарта с общей концентрацией 1 мкг/мл и 50 мл перегнанного гексана, перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 ч при нагревании с использованием обратного холодильника. Затем полученное извлечение отфильтровывают через стекловату и проводят повторную экстракцию 30 мл гексана. Остаток на фильтре промывают 30 мл гексана и промывную жидкость объединяют с полученными извлечениями. К объединенному извлечению добавляют натрия сульфат безводный в соотношении 1:10 и выдерживают 1-1,5 ч, а затем упаривают на роторном вакуумном испарителе до объема 10-15 мл.

В делительную воронку вместимостью 100 мл помещают 10-15 мл полученного объединенного извлечения и прибавляют 20-25 мл серной кислоты концентрированной. Содержимое делительной воронки осторожно встряхивают 5-10 раз и оставляют до расслоения фаз, после чего нижний слой (кислотный) отбрасывают. Очистку повторяют несколько раз до получения бесцветного слоя серной кислоты. Очищенные извлечения нейтрализуют натрия гидрокарбоната раствором 0,5 М и промывают водой очищенной до нейтральной реакции промывных вод, после чего извлечения пропускают через колонку (длиной 10 см и диаметром 1 см), последовательно заполненную алюминия оксидом (высота слоя 3 см) и натрия сульфатом безводным (высота слоя 3 см). Колонку промывают 20 мл метиленхлорида. Полученное очищенное извлечение упаривают на роторном вакуумном испарителе досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПОСОБ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Для проведения анализа может быть использован альтернативный способ пробоподготовки.

Измельчают около 50 г лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата (проба для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка) и просеивают через сито с размером отверстий 0,5 мм. Затем помещают 10 г (точная навеска) измельченного образца в тefлоновую пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляют 10 мл ацетонитрила для хроматографии, тщательно встряхивают в течение 1 мин, добавляют 4 г безводного магния сульфата, 1 г натрия хлорида, тщательно встряхивают в течение 1 мин. Затем экстракт центрифугируют в течение 3 мин при 5000 об/мин. После центрифугирования из пробирки из верхнего слоя переносят аликвоту объемом 6 мл в тefлоновую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 мл, содержащую 150 мг сорбента, представляющего собой смесь первичных и вторичных аминов, и 950 мг магния сульфата безводного, и снова центрифугируют в течение 3 мин при 5000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. 1,5 мл полученного фильтрата переносят в хроматографическую вialsу, содержащую 15 мкл муравьиной кислоты раствора 5 % в ацетонитриле (для стабилизации экстракта). Проводят определение содержания остаточных пестицидов методом ГХ/МС или ВЭЖХ/МС.

В качестве внутреннего стандарта может быть использован трифенилфосфат. Его добавляют в начальной стадии пробоподготовки одновременно с ацетонитрилом в концентрации 1 мкг/мл для ВЭЖХ/МС или 10 мкг/мл для ГХ/МС.

Могут быть использованы другие методики пробоподготовки при условии их валидации.

Проведение измерений

Хроматомасс-спектрометрический анализ полученных растворов

проводят на газовом хроматографе с масс-селективным детектором с использованием стандартных веществ (стандартный образец состава: α -гексахлорциклогексан, γ -гексахлорциклогексан, ДДТ, ДДЕ, ДДД, альдрин, гептахлор), а также внутреннего стандарта – 4,4'-дибромдифенила.

Для анализа используют 30 м кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер 5% дифенила и 95% диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,3 мкм или любую аналогичную. Анализ осуществляют при условиях, указанных в табл. 2.

Масс-спектры регистрируют при ионизации электронным ударом с энергией ионизации 70 эВ. Скорость сканирования должна составлять 1 скан/с при диапазоне сканирования 40-600 а.е.м.

Таблица 2 – Условия хроматомасс-спектрометрического анализа остаточных пестицидов (хлорсодержащих) на колонке HP-5MS

$T_{\text{нач.}}, ^\circ\text{C}$	$v, ^\circ\text{C}/\text{мин}$	$T_{\text{конеч.}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{исп.}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{инт.}}, ^\circ\text{C}$	$V, \text{мкл}$
70	10	300	280	280	1

Примечание: $T_{\text{нач.}}$ – начальная температура термостата колонки (выдержка 4 мин.); v – скорость линейного нагрева колонки; $T_{\text{конеч.}}$ – конечная температура колонки (выдержка 5 мин.); $T_{\text{исп.}}$ – температура испарителя; $T_{\text{инт.}}$ – температура интерфейса; V , мкл – объем вводимой пробы.

Хроматомасс-спектрометрический анализ проводят в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов с идентификацией пестицидов по характеристическим ионам и времени удерживания с использованием растворов стандартных образцов (табл. 3).

Таблица 3 – Хроматографические и масс-спектрометрические данные анализа растворов стандартных образцов хлорорганических пестицидов (ХОП) и полихлорбифенилов (ПХБ)

Наименование ХОП или ПХБ	Время удерживания, мин	Характеристические ионы, m/z	Относительное время удерживания
α -ГХЦГ	17,26	219, 183, 217, 181	0,848
β -ГХЦГ	17,82		0,874
γ -ГХЦГ	17,96		0,881

Наименование ХОП или ПХБ	Время удерживания, мин	Характеристические ионы, m/z	Относительное время удерживания
ДДТ	23,49	235, 237, 165	1,152
ДДД	22,80		1,118
ДДЕ	22,02	318, 246, 248	1,080
Альдрин	20,14	263, 298, 66	0,988
Гептахлор	19,45	272, 274, 339, 237	0,954
4,4'-Дибром- дифенил	20,39	312, 310, 314, 152	1,000

Примечание: Данные представлены для колонки HP-5MS.

Критериями идентификации являются:

- времена удерживания, которые не должны отличаться более чем на 0,5 мин от времени удерживания стандартного вещества;
- относительные интенсивности пиков характеристических ионов на реконструированной хроматограмме не должны отличаться более чем на 20% от относительной интенсивности этих пиков в масс-спектре стандартного вещества, полученного на данной хроматомасс-спектрометрической системе;
- синхронность максимумов пиков характеристических ионов;
- соотношение сигнал/шум, которое должно быть не менее 3:1.

Условия проведения измерений могут быть иными при использовании других детекторов, при этом методика должна быть валидирована.

Обработка результатов измерений

Содержание пестицидов в лекарственном растительном сырье/препарате рассчитывают методом внешнего стандарта, в качестве которого используют растворы стандартных веществ определяемых соединений. Для количественной оценки используют пробы, извлечение из которых внутренних стандартов составляет 70-110 %. Рассчитывают среднее значение из трех измерений площадей пиков анализируемых веществ.

Количество определяемого компонента ($C_{уен}$) в нг/г или нг/мл вычисляют по формуле:

$$C_{исп} = \frac{S}{S_{ст} \cdot P(V)} \cdot C_{ст} - C_{контр},$$

где $C_{контр}$ – концентрация определяемого соединения в контрольной пробе, нг/г или нг/мл;

S – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме испытуемого раствора;

$C_{ст}$ – концентрация определяемого соединения в стандартном растворе;

$S_{ст}$ – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме стандартного раствора;

$P(V)$ – навеска в г или объем пробы в мл.

Для перевода концентрации в мг/кг полученное значение следует разделить на 1000.

Определение соответствия остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах допустимым нормам

Пределы допустимого содержания остаточных хлорсодержащих пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах не должны превышать значения, указанные в табл. 4.

Таблица 4 – Пределы допустимого содержания остаточных пестицидов (хлорсодержащих) в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
Гексахлорциклогексан и его изомеры (в сумме)	0,1
ДДТ и его метаболиты (в сумме)	0,1
Алдрин	Не допускается
Гептахлор	Не допускается

Если нет других указаний в фармакопейной статье, количество других остаточных пестицидов не должно превышать значений предельно допустимого содержания, указанных в табл. 5.

Таблица 5 – Пределы допустимого содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

N п/п	Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
1	Азинфос-метил	1,0
2	Азинфос-этил	0,1
3	Алахлор	0,02
4	Ацефат	0,1
5	Бромид, неорганический (в пересчете на бромид ион)	50
6	Бромфос-метил	0,05
7	Бромфос-этил	0,05
8	Бромпропилат	3,0
9	Винклозолин	0,4
10	Гексахлорбензол	0,1
11	Дельтаметрин	0,5
12	Диазинон	0,5
13	Дихлофлуанид	0,1
14	Дихлорфос	1,0
15	Дикофол	0,5
16	Диметоат и ометоат (в сумме)	0,1
17	Дитиокарбаматы (в пересчете на CS ₂)	2,0
18	Квиналфос	0,05
19	Квинтоцен (в сумме с пентахлоранилином и метилпентахлорфенилсульфидом)	1,0
20	Малатион (в сумме с малаксоном)	1,0
21	Мекарбам	0,05
22	Метакрифос	0,05
23	Метамидофос	0,05
24	Метидатион	0,2
25	Метоксихлор	0,05
26	Мирекс	0,01
27	Монокротофос	0,1
28	Паратион-метил и параоксон-метил (в сумме)	0,2
29	Паратион-этил и параоксон-этил (в сумме)	0,5
30	Пендиметалин	0,1
31	Пентахлоранизол	0,01
32	Перметрин и изомеры (в сумме)	1,0
33	Пиперонилбутоксид	3,0
34	Пиретрум (цинерин I, цинерин II, джасмолин I, джасмолин II, пиретрин I и пиретрин II в сумме)	3,0
35	Пиримифос-метил и с N-дезэтил-пиримифос-метил в сумме	4,0
36	Пиримифос-этил	0,05
37	Протиофос	0,05
38	Профенофос	0,1
39	Процимидон	0,1
40	C-421	0,02
41	Текназен	0,05

Продолжение таблицы 5

N п/п	Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
42	Тетрадифон	0,3
43	Фенвалерат	1,5
44	Фенитротион	0,5
45	Фенпропатрин	0,03
46	Фенсульфотион (в сумме)	0,05
47	Фентион (в сумме)	0,05
48	Фенхлорофос (сумма фенхлорофоса и фенхлорофосоксона)	0,1
49	τ-Флувалинат	0,05
50	Флуцитринат	0,05
51	Фонофос	0,05
52	Фозалон	0,1
53	Фосмет	0,05
54	Хлордан (сумма <i>цис</i> -, <i>транс</i> - и оксихлордана)	0,05
55	Хлорпирифос-метил	0,1
56	Хлорпирифос-этил	0,2
57	Хлортал-диметил	0,01
58	Хлорфенвинфос	0,5
59	λ-Цигалотрин	1,0
60	Циперметрин и изомеры (в сумме)	1,0
61	Цифлутрин (в сумме)	0,1
62	Эндосульфат (изомеры и эндосульфата сульфат в сумме)	3,0
63	Эндрин	0,05
64	Этион	2,0
65	Этримфос	0,05

Значение пределов допустимого содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ПДСОП_{ЛРС}), не включенных в табл. 5, рассчитывают по формуле с учетом значения уровня допустимого суточного потребления вещества, рекомендованного ФАО/ВОЗ, и величины дозы суточного потребления лекарственного растительного сырья/препарата:

$$\text{ПДСОП}_{\text{ЛРС}} = \frac{\text{ДСП} \cdot \text{М}}{\text{МСД} \cdot 100}$$

где ДСП – допустимое суточное потребление вещества* в мг на кг массы тела;

М – масса тела, кг (60 кг);

МСД – суточная доза лекарственного растительного сырья, кг;

100 – фактор потребления**.

Значение предельно допустимого содержания остаточных пестицидов в

лекарственном растительном препарате ($\text{ПДСОП}_{\text{ЛРП}}$) рассчитывают по формуле:

$$1) \text{Э} \leq 10$$

$$\text{ПДСОП}_{\text{ЛРП}} = \text{ПДСОП}_{\text{ЛРС}} \cdot \text{Э},$$

$$2) \text{Э} > 10$$

$$\text{ПДСОП}_{\text{ЛРП}} = \frac{\text{ДСП} \cdot \text{М} \cdot \text{Э}}{\text{МСДП} \cdot 100}$$

где ДСП - допустимое суточное потребление вещества* в мг на кг массы тела;

М – масса тела в кг (60 кг);

100 – фактор потребления**;

Э – фактор экстракции определяется экспериментально, как соотношение между количеством сырья и количеством полученного препарата;

МСДП – суточная доза лекарственного растительного препарата в кг.

Примечания:

* - как опубликовано Организацией по продовольствию и сельскому хозяйству ВОЗ;

** - относится к требованию ВОЗ о том, что количество остаточных пестицидов, потребляемых из ЛРС, не должно превышать 1% от общего количества потребляемых пестицидов.

Если в ходе анализа установлено превышение допустимых норм остаточных пестицидов, организация, проводившая анализ, должна поставить в известность производителя готовой продукции и оптовое или розничное предприятие, через которое данное лекарственное растительное сырье или лекарственный растительный препарат поступил на реализацию.

**Определение коэффициента
водопоглощения**

ОФС.1.5.3.0012.15

**и расходного коэффициента
лекарственного растительного сырья**

Вводится впервые

Коэффициент водопоглощения – показатель, определяющий количество воды в миллилитрах, удерживаемое 1 г лекарственного растительного сырья после его отжатия в перфорированном стакане инфундирного аппарата. Коэффициент водопоглощения используется для расчетов при получении водных извлечений из лекарственного растительного сырья.

Для определения коэффициента водопоглощения навеску цельного или измельченного лекарственного растительного сырья массой 10,0 г заливают водой очищенной и готовят водное извлечение в соответствии с ОФС «Настои и отвары». После изготовления полученное водное извлечение процеживают, оставшееся сырье отжимают в перфорированном стакане инфундирки и измеряют объем полученного водного извлечения.

Коэффициент водопоглощения (K_{en}) рассчитывают по следующей формуле:

$$K_{en} = \frac{V_1 - V_2}{a},$$

где V_1 – объем водного извлечения, который необходимо получить, мл;

V_2 – объем водного извлечения, который был получен после отжатия сырья, мл;

a – навеска лекарственного растительного сырья, взятая для приготовления водного извлечения, г.

Коэффициент водопоглощения рассчитывают как среднее арифметическое результатов 3 параллельных определений.

В таблице 1 приведены значения коэффициентов водопоглощения для отдельных видов лекарственного растительного сырья.

Таблица 1 – Коэффициенты водопоглощения некоторых видов лекарственного растительного сырья

Вид сырья	Коэффициент	Вид сырья	Коэффициент
Валерианы корневища с корнями	2,9	Мать-и-мачехи листья	3,0
Горицвета трава	2,8	Мяты перечной листья	2,4
Горца змеиног (змеевика) корневища	2,0	Подорожника большого листья	2,5
Дуба кора	2,0	Полыни горькой трава	2,1
Душицы трава	2,0	Пустырника трава	2,0
Зверобоя трава	1,6	Ромашки аптечной цветки	3,4
Калины кора	2,0	Сенны листья	1,8
Крапивы листья	1,8	Солодки корни	1,7
Кровохлебки корневища и корни	1,7	Сушеницы трава	2,2
Крушины кора	1,6	Толокнянки листья	1,4
Лапчатки корневища	1,4	Шалфея листья	3,3
		Шиповника плоды	1,1

Если коэффициент водопоглощения для лекарственного растительного сырья отсутствует, используют его следующие условные значения:

- для корней и корневищ – 1,5 мл/г;
- для коры, почек, травы и цветков – 2,0 мл/г;
- для семян – 3,0 мл/г.

Объем воды ($V_{\text{вл}}$), необходимый для изготовления водного извлечения с учетом коэффициента водопоглощения ($K_{\text{вл}}$), рассчитывают по следующей формуле:

$$V_{\text{вл}} = V + m \cdot K_{\text{вл}},$$

где V – объем водного извлечения, который необходимо получить, мл;
 m – масса лекарственного растительного сырья, необходимая для приготовления водного извлечения, г;
 $K_{\text{вл}}$ – коэффициент водопоглощения данного лекарственного растительного сырья.

Для лекарственного растительного сырья, содержащего слизь, в частности – корней алтея, определяют расходный коэффициент (K_p).

Расходный коэффициент показывает, во сколько раз следует увеличить массу сырья и объем воды очищенной, чтобы получить требуемый объем (мл) водного извлечения. Данный показатель характеризует качество лекарственного растительного сырья, содержащего слизь, и позволяет контролировать процессы его заготовки и сушки.

Расходные коэффициенты для изготовления водного извлечения корней алтея при различных соотношениях сырья и экстрагента приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Расходные коэффициенты для изготовления водного извлечения корней алтея при различных соотношениях сырья и экстрагента

Соотношение сырье-экстрагент	Расходный коэффициент корней алтея, K_p
1 : 100	1,05
1 : 50	1,10
1 : 30	1,15
1 : 25	1,20
1 : 20	1,30

Для водного извлечения корней алтея с концентрацией более 5 % (1:20) расходный коэффициент (K_p) рассчитывают по формуле:

$$K_p = \frac{100}{100 - (m \cdot 4,6)}$$

где m – количество корня алтея (г), необходимое для изготовления 100 мл водного извлечения необходимой концентрации;

4,6 – постоянная величина, показывающая, что 1 г корня алтея удерживает 4,6 мл водного извлечения.

Аллергены

ОФС.1.7.1.0001.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на препараты аллергенов природного происхождения.

КЛАССИФИКАЦИЯ

Аллергены представляют собой водно-солевые экстракты белково-полисахаридных комплексов, выделенных из широкого круга веществ – источников природных аллергенов, которые являются веществами, вызывающими или провоцирующими аллергические заболевания. Препараты аллергенов предназначены для *in vivo* диагностики и лечения аллергических заболеваний, опосредованных иммунологическими реакциями повышенной чувствительности (IgE-зависимые) к аллергенам различной природы.

Аллергены классифицируют на неинфекционные (пыльцевые, бытовые, эпидермальные, пищевые, инсектные) и инфекционные (грибковые, бактериальные). Аллергены, обработанные химическими веществами (например, формальдегидом или цианатом калия), называют аллергоидами.

Аллергены и аллергоиды производят в виде монопрепаратов, содержащих экстракт из сырья одного вида, а также в виде микст-препаратов, содержащих экстракты из нескольких видов сырья.

В качестве консерванта в состав препаратов аллергенов могут входить фенол (2,0 – 4,0 мг/мл) или формальдегид (не более 0,14 мг/мл).

Препараты на основе аллергенов могут выпускаться в виде парентеральных, пероральных, сублингвальных, ингаляционных и

офтальмологических лекарственных препаратов или препаратов для проведения кожных проб.

Для диагностических целей используют немодифицированные экстракты аллергенов или экстракты в 50 % растворе глицерина для кожных проб. Для провокационных аллергологических тестов аллергены могут быть приготовлены разведением готовых форм аллергенов до минимальных концентраций непосредственно перед введением интраназальным, конъюнктивальным или эндобронхиальным способом.

Для иммунотерапии применяют инъекционные формы немодифицированных и модифицированных экстрактов аллергенов (аллергоиды), аллергены, адсорбированные на различных носителях (алюминия гидроксид, кальция фосфат или L-тирозин), экстракты аллергенов в 50 % растворе глицерина для приема внутрь или в виде таблеток для сублингвального использования.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства должна обеспечивать безопасность, эффективность и стабильность аллергенов.

Характеристика исходных материалов

Исходными материалами для приготовления препаратов на основе аллергенов являются пыльца растений, микрофлора жилых и служебных помещений, эпителий животных, пищевые продукты, плесневые грибы, бактерии. Условия сбора, предварительная обработка, условия хранения исходных материалов должны обеспечивать постоянный качественный и количественный состав и стандартность в максимально возможной степени.

Пыльцевые аллергены

Сырьем для изготовления пыльцевых аллергенов и аллергоидов является растительная пыльца.

Сбор пыльцы проводят в период цветения. Созревание пыльцы обеспечивают в определенных условиях (поллинариях), сушат до остаточной влажности ($3 \pm 0,5$) %. Пыльцу каждого вида растений характеризуют по

морфологическим признакам (диаметр пыльцевого зерна, структура экзимы, форма пыльцевого зерна). Допускается не более 10 % примесей других видов пыльцы (определяется микроскопическим способом).

Для стандартизации сырья при изготовлении одной серии препарата рекомендуется использование пыльцы, собранной в течение 2 – 3 календарных лет, в связи с различными климатическими и гидрологическими условиями созревания пыльцы.

Содержание тяжелых металлов в сульфатной золе из 1 г пыльцы (точная навеска) – не более 0, 001 %. Зараженность растительной пыльцы амбарными вредителями не должна превышать I степени чистоты.

Аллергены жилых и служебных помещений (бытовые аллергены)

Сырье, используемое для изготовления бытовых аллергенов (домашняя пыль, библиотечная пыль, перо подушек), собирают отдельно для каждого наименования аллергена. Домашнюю пыль собирают путем сбора бытовым пылесосом с верхних поверхностей предметов, мебели, постели (запрещается собирать пыль с пола и ковров) в квартирах больных, имеющих установленную аллергологической службой аллергию к данному сырью. Домашняя пыль, перо подушек, библиотечная пыль не должны содержать посторонние включения. Сбор и обработка перечисленного сырья проводится в соответствии с требованиями указанными в фармакопейной статье или в нормативной документации на конкретные препараты.

Клещи домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* культивируют в течение 3 – 4 мес в среде (домашняя пыль) при определенных заданных условиях температуры, влажности, ежедневной аэрации, контроле видовой принадлежности. Клещи должны быть отделены от среды культивирования и гомогенизированы для последующего выполнения операционных процессов.

Вид клеща удостоверяется паспортом подлинности (отсутствием клещей другого вида), в котором указывают вид сырья, сроки культивирования, результаты контроля сырья.

Сырьем для изготовления аллергена из дафний должны служить пресноводные рачки дафнии magna (*Daphnia magna*).

Эпидермальные аллергены

Сырьем для изготовления эпидермальных аллергенов является шерсть животных (кошки, собаки, овцы, кролика, морской свинки), перхоть лошади, волосы человека. У животных, используемых для приготовления эпидермального сырья, должны быть ветеринарные паспорта, подтверждающие их здоровье, отсутствие инфекционных агентов и гельминтов. Сырье не должно содержать посторонних включений и шерсти других животных.

Пищевые аллергены

Сырье для их изготовления (говядина, мясо курицы или утки, рыба, крупы, овощи, фрукты) получают из хозяйств, в которых не зарегистрированы вирусные, бактериальные и другие заболевания.

Инсектные аллергены

Различные виды насекомых (пчелы, осы, комары и т.п.), из которых экстрагируется аллерген, должны быть идентифицированы и описаны. Методы сбора насекомых и экстракция яда должны гарантировать надлежащее качество исходных материалов.

Грибковые аллергены

Представляют собой водно-солевые растворы гликопротеидов, полученные из высушенного и обезжиренного мицелия соответствующего вида грибов с последующим экстрагированием солевым раствором и спиртовым фракционированием. Содержание биологически активных примесей, таких как микотоксины, в плесневых грибах должно быть минимизировано.

Бактериальные аллергены

Представляют собой экстракт смеси инаktivированных фенолом клеток бактерий и продуктов их метаболизма. Штаммы бактерий должны

быть зарегистрированы и быть типичными по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.

Получение аллергенного экстракта

Аллергены получают путем экстракции исходного сырья с использованием методов, направленных на сохранение биологических свойств аллергенных компонентов. Сырье сушат, обезжиривают и выделяют белково-полисахаридные комплексы с помощью водно-солевой экстракции с последующим диализом, концентрированием, центрифугированием и стерилизующей фильтрацией, обеспечивающей получение продукта, свободного от контаминации, которая может повлиять на его безопасность и качество.

Контрольные испытания аллергенных экстрактов

Аллергенный экстракт должен удовлетворять требованиям по физическим свойствам, стерильности, значению pH, общего белка/белкового азота, специфической/аллергенной активности, аномальной токсичности. Если в готовой форме проведение испытания по показателю «Аномальная токсичность» невозможно (например, препараты с 40–60 % содержанием глицерина, алюминия гидроксида или кальция фосфата), то этому испытанию подвергается экстракт.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

По содержанию единиц белкового азота (protein nitrogen unit – PNU) в 1мл препарата. 1 PNU – международная единица, принятая для выражения концентрации белкового азота в аллергенах, равная 0,00001 мг белкового азота. В основе стандартизации по системе PNU лежит положение о том, что большинство аллергенов имеют белковую природу. Однако содержание белкового азота в полной мере не отражает биологическую активность аллергенов, т.к. не все экстрагируемые белки обладают аллергенными свойствами. В системе стандартизации по PNU специфическую активность препаратов необходимо подтверждать кожными пробами.

По биологической активности, которую определяют относительно активности стандартного образца (СО) аллергена. Его биологическую активность устанавливают тестами *in vivo*. СО может использоваться при контроле серий промежуточных аллергенных продуктов (аллергенный экстракт) и при контроле серии конечных препаратов аллергенов.

Характеристика СО

СО представляет собой одну из серий аллергенного экстракта или готового препарата аллергена, которая должна быть охарактеризована по следующим показателям: содержанию общего белка, белковому профилю, аллергенным компонентам, специфической активности. Диапазон характеристик СО зависит от природы исходного материала, сведений о его аллергенных компонентах и наличия используемых реактивов.

Общий белок определяют любым подходящим методом, изложенным в ОФС «Определение белка».

Белковый профиль должен быть охарактеризован одним из следующих методов – иммуноэлектрофорезом в полиакриламидном геле с натрием додецилсульфатом (SDS-PAGE электрофорез), иммуноэлектрофорезом, капиллярным электрофорезом, хроматографией, масс-спектрометрией.

Подлинность. Выявление специфических аллергенных компонентов осуществляется методами вестерн-блот или иммуноферментного анализа (ИФА) (ОФС «Определение подлинности препаратов аллергенов») с использованием специфических IgE-содержащих сывороток крови от лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену.

Отдельные аллергенные компоненты (главные аллергены) могут быть обнаружены с помощью моноклональных антител.

Количественное определение главных аллергенов проводят с помощью ИФА с использованием соответствующих одноименных стандартов.

Биологическую активность первой серии СО определяют методами *in vivo* (например, кожные пробы) у 15 – 20 лиц, сенсibilизированных к

исследуемому аллергену. Результаты исследования выражают в условных единицах биологической активности. Биологическую активность последующих серий СО оценивают конкурентным иммуноанализом (ИФА, РАСТ, иммуноблоттинг и т.п.), основанном на ингибировании связывающей способности специфических антител иммуноглобулина Е.

Получение готового продукта

Аллергенный экстракт разводят до конечных концентраций белка, установленных для каждого наименования готового препарата, разливают и укупоривают, обеспечивая стерильность и сохранение активности и физико-химических свойств препарата на протяжении срока годности.

ИСПЫТАНИЯ

Диапазон показателей, по которым проводят испытания, зависит от формы выпуска препаратов (лиофилизаты, растворы, суспензии, таблетки).

Описание. Приводится описание соответствующей лекарственной формы препарата. Испытание проводят визуально.

Подлинность. В аллергенах и аллергоидах должны быть обнаружены специфические аллергенные компоненты. Испытания проводят по ОФС «Определение подлинности препаратов аллергенов» или любым подходящим методом, изложенным в нормативной документации.

Прозрачность (для растворов). Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» с использованием эталонов сравнения, как указано в нормативной документации.

рН (для растворов и суспензий). Допустимое значение рН для аллергенов – от 6,5 до 7,3, аллергоидов – от 7,3 до 7,7, если в нормативной документации не указаны другие требования. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения (для растворов и суспензий). Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Размер частиц (для суспензий). Нормативные требования указывают в фармакопейной статье и нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Распадаемость (для таблеток). Не более 2 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Время седиментационной устойчивости (для суспензий). Нормативные требования указываются в фармакопейной статье и нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Извлекаемый объем (для растворов, суспензий). Должен быть не менее номинального. Определение проводят по ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Вода (для лиофилизатов и таблеток). Не более 5 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение воды» методом титрования по К. Фишеру или гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение потери в массе при высушивании».

Общий белок (для препаратов, стандартизированных в единицах биологической активности). Нормативные требования указываются в нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение белка».

Белковый азот (для препаратов, стандартизированных в единицах PNU) – от 3000 до 12500 PNU. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» методом Кьельдаля или колориметрическим методом с реактивом Несслера.

Стерильность (для инъекционных форм). Лекарственные препараты должны быть стерильными. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методами прямого посева или мембранной фильтрации.

Микробиологическая чистота (для пероральных и сублингвальных форм) – категория 3А. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность (растворы для инъекций). Лекарственные препараты должны быть не токсичны. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Указывают тест-дозы, способ введения и время наблюдения за животными, их вид и массу.

Специфическая/аллергенная активность

Специфическая активность, остаточная аллергенность (тесты *in vivo*). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности препаратов аллергенов методом кожных проб».

Аллергенная активность (тесты *in vitro*) – 50 – 150 % от указанного количества. Аллергенную активность препаратов определяют с использованием СО методами конкурентного иммуноанализа с использованием специфических сывороток, содержащих IgE-антитела.

Фенол (для аллергенов). От 2,0 до 4,0 мг/мл. Определение проводят по ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Формальдегид (для алергоидов). Не более 0,14 мг/мл. Определение проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Глицерин (для пероральных и сублингвальных препаратов) – от 40 до 60 %. Определение проводят методом, изложенным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Алюминий (для суспензий). От 80 до 120 % от указанного количества. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Кальций (для суспензий) От 80 до 120 % от указанного количества. Определение проводят любым подходящим методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

РАСТВОРИТЕЛИ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ С ПРЕПАРАТОМ

Препараты аллергенов могут выпускаться в комплекте с растворителями и реагентами. Растворители и реагенты подвергаются испытаниям, аналогичным испытаниям для основного препарата (аллергена/аллергоида).

Тест-контрольная жидкость (для бытовых, пищевых, пылевых, эпидермальных аллергенов) – фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 6,75 до 7,25.

Назначение – отрицательный контроль при постановке кожных проб.

Разводящая жидкость (для бытовых аллергенов). Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 6,75 до 7,25.

Назначение – для разведения бытовых аллергенов при проведении специфической иммунотерапии.

Разводящая жидкость (для пылевых аллергенов). Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 6,8 до 7,2.

Назначение – для разведения пылевых аллергенов при проведении специфической иммунотерапии.

Разводящая жидкость (для аллергоидов) – 0,1 М фосфатный буферный раствор, pH от 7,3 до 7,7.

Назначение – разведение аллергоидов при проведении специфической иммунотерапии.

Упаковка и маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Необходимо указание «Отпускается по рецепту».

Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Жидкие лекарственные препараты не допускается замораживать.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Бактериофаги**ОФС.1.7.1.0002.15****Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лечебно-профилактические бактериофаги, лекарственные средства, содержащие комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий, которые вызывают гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, сопровождающегося выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Бактериофаги являются вирусами бактерий. По типу взаимодействия с бактериальной клеткой фаги подразделяются на вирулентные (вызывающие гибель бактерий) и умеренные, которые, инфицируя бактериальную клетку, встраиваются в ее генетический аппарат и репродуцируются в процессе деления клетки, не вызывая ее лизис. В медицине бактериофаги используют для лечения и профилактики гнойно-септических и кишечных инфекций, а также в диагностических целях для индикации, видового и внутривидового дифференцирования бактерий.

Лечебно-профилактические бактериофаги содержат только вирулентные фаги. Эти препараты представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий, освобожденные от эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, а также их антигенных комплексов и белковых компонентов питательных сред.

Благодаря строгой специфичности действия лечебно-профилактические бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунной защиты, не обладают токсическим действием и не вызывают аллергизации. Наличие резистентности бактерий к антибиотикам не влияет на литическую активность бактериофагов.

Лечебно-профилактические бактериофаги применяют для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний и кишечных инфекций, коррекции дисбиотических состояний. Главным условием клинической эффективности при назначении бактериофагов является фагочувствительность бактерий-возбудителей.

Лечебно-профилактические бактериофаги по своему составу подразделяются на (таблица):

– *монокомпонентные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие вирулентные фаги против одного рода или вида бактерий;

– *комбинированные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов.

Активность этой группы лекарственных средств выражают в показателях титра максимального разведения, дающего полный фаголизис соответствующих препарату видов бактериальных штаммов, определяемый по методу Аппельмана. Показатели специфической активности для каждого препарата указаны в соответствующих фармакопейных статьях.

Лечебно-профилактические бактериофаги используют для перорального, наружного, местного, ректального применения, интраназального и конъюнктивального введения, введения в дренированные полости. Их выпускают в различных лекарственных формах – в растворах, в виде таблеток, суппозиториях, линиментов, мазей (табл.)

Таблица - Лечебно-профилактические бактериофаги и их целевая направленность

Наименование препарата бактериофага	Специфическая направленность
Монокомпонентные	
Стафилококковый	<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. aureus</i>)
Стрептококковый	<i>Streptococcus</i> spp. (в том числе, <i>Enterococcus</i> spp.)
Псевдомонас аэругиноза (синегнойный)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Коли	<i>Escherichia coli</i>
Протейный	<i>Proteus mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>
Дизентерийный поливалентный	<i>Shigella flexneri</i> 1,2,3,4,6 сероваров; <i>S. sonnei</i>
Брюшнотифозный	<i>Salmonella typhi</i>
Сальмонеллезный гр. АВСДЕ	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi</i> А, <i>S. paratyphi</i> В, <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i>
Клебсиелл пневмонии	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Комбинированные	
Коли-протейный	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>
Клебсиеллезный поливалентный	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
Пиобактериофаг комплексный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
Интести	<i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi</i> А, <i>S. paratyphi</i> В, <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>

ПРОИЗВОДСТВО

Организация производства лечебно-профилактических бактериофагов осуществляется согласно действующим государственным санитарным правилам с учетом требований системы обеспечения качества надлежащей

практики производства. Вместе с тем имеются определенные особенности в комплектации и размещении производственных помещений.

Для работы со штаммами бактерий, выделенных из разных источников (патологического материала и объектов внешней среды), и для выделения фагов из патологического материала и объектов внешней среды (почва, сточные воды и т.д.) необходимы изолированные от производства боксы для проведения микробиологических исследований.

Обязательными начальными этапами работы являются:

- выделение чистых культур перспективных штаммов бактерий (т.е. кандидатов в производственные штаммы бактерий);
- выделение вирулентных бактериофагов для пополнения коллекции «маточных» фагов.

В производственной зоне должны быть предусмотрены отдельные микробиологические боксы для работы с производственными бактериальными штаммами и маточными фагами.

При производстве фаговых препаратов проводят валидацию технологического процесса, технологического оборудования, сырья и методов контроля. Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь документы, подтверждающие их качество. Вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственных средств с лечебно-профилактическими бактериофагами, должны быть разрешены к медицинскому применению и использоваться в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Питательные среды

Производственные питательные среды не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Питательные среды должны обладать хорошими ростовыми свойствами и быть стерильными. Сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны быть

пригодны для соответствующих целей и их качество должно быть подтверждено документально.

Для включения в фармакопейную статью рекомендуются следующие питательные среды: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (1,5 – 2 %) или бульон и агар Хоттингера (1,5 – 2 %) с необходимыми добавками в зависимости от специфических потребностей бактерий-мишеней фаговых препаратов. Возможно использование других питательных сред специального назначения, например, для возбудителей особо опасных инфекций.

Требования к производственным штаммам

Производственные штаммы бактерий-продуцентов бактериофагов выделяют от больных гнойно-септическими или кишечными инфекциями и получают из бактериологических диагностических лабораторий (желательно расположенных в регионах реализации и потребления лечебно-профилактических бактериофагов). Коллекция производственных штаммов бактерий, используемых в производстве бактериофагов, должна ежегодно обновляться свежевыделенными штаммами от больных не менее чем на одну треть.

Производственные штаммы бактерий должны обладать типичными для каждого вида морфологическими, культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, не продуцировать энтеротоксины и не содержать умеренных бактериофагов в своем геноме.

Производственные штаммы бактерий должны лизироваться маточными фагами по методу Аппельмана в титрах не менее чем на 1–2 порядка выше показателей специфической активности конечного продукта. При этом стабильность лизиса должна сохраняться после (48 ± 3) ч инкубирования при температуре 37 °C.

Производственные штаммы бактерий хранят в специальных изолированных помещениях в лиофилизированном состоянии в ампулах при температуре 2 – 8 °C в течение 10 лет и в пробирках с 0,4 – 0,7 %

агаризованной питательной средой (на основе гидролизата Хоттингера или МПБ) под стерильным вазелиновым маслом при температуре 2 – 8 °С не более 1 года при регулярном пересеве каждые 2 – 3 мес.

Контрольные штаммы бактерий. При определении специфической активности готовых препаратов бактериофагов в качестве контрольных отбирают штаммы из коллекции производственных штаммов бактерий. Они не должны использоваться при производстве данной серии препарата.

Маточные бактериофаги. Для получения фаговых препаратов используются только вирулентные бактериофаги. Их выделяют из природных источников – клинического материала, сточных вод, почвы, пассируя на штаммах гомологичных видов бактерий – свежевыделенных и производственных. Подбирают высоко активные расы (штаммы) фагов к слаболизирующим и фагорезистентным штаммам бактерий. Пополнение производственных фаговых рас различными штаммами из природных источников позволяет преодолевать первичную фагоустойчивость возбудителей.

Маточные бактериофаги должны включать только вирулентные фаги с широким диапазоном действия по отношению к штаммам гомологичного вида бактерий, обладать высокой активностью, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия и высокой «урожайностью». Характеристика кандидатных фаговых рас (штаммов) при отборе может быть дополнена электронно-микроскопическим изучением их морфологии и другими современными молекулярно-биологическими методами (например, методом секвенирования – определения последовательности фаговой ДНК). Хранение производственной коллекции бактериофагов осуществляется на гомологичных бактериальных штаммах при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 лет с ежегодным пересевом.

Работа с производственными штаммами бактерий и бактериофагов, а именно регулярное пополнение производственных бактериальных штаммов за счет клинических изолятов и подбор к ним фаговых рас из природных

источников, обеспечивает возможность адаптации лечебно-профилактических бактериофагов к циркулирующим возбудителям бактериальных инфекций. Таким образом, возможен выпуск производственных серий бактериофагов целевого назначения. Например, при вспышке или в очаге инфекции, обусловленной фагоустойчивым возбудителем, передача на производство эпидемически значимого бактериального штамма позволит адаптировать препарат из бактериофагов к конкретным эпидемиологическим условиям.

Диапазон действия лечебно-профилактических бактериофагов, их активность в отношении современных возбудителей бактериальных инфекций во многом зависят от организации сбора клинических штаммов.

Краткое описание технологического процесса

Производственный процесс включает следующие основные этапы: работа с возбудителями гнойно-септических и кишечных бактериальных инфекций, подбор к ним активных фаговых рас, работа с коллекцией производственных бактериальных штаммов, регулярно пополняемых свежевыделенными бактериями.

Культивирование бактериофагов проводят в реакторах (ферментерах) путем посева производственных штаммов бактерий и маточных фагов, содержащих несколько высокоактивных фаговых рас. После завершения процесса фаголизиса для очистки фаголизатов от фрагментов бактериальных клеток, их метаболитов, в том числе энтеротоксинов и белковых компонентов питательной среды, культуральную суспензию пропускают через микрофльтрационные установки. Полученный фаголизат подвергают ультрафильтрации и концентрированию с последующей стерилизующей фильтрацией. Далее из полученного стерильного концентрата фаголизатов готовят жидкий препарат путем разведения 0,9 % раствором натрия хлорида со стабилизаторами или получают лиофилизированную биомассу, предназначенную для получения таблеток (лиофилизируя концентрат фаголизатов при соответствующих условиях).

В процессе производства бактериофагов оценивают качество исходных, промежуточных и окончательных продуктов на следующих основных этапах и тестах.

1. Подготовка производственных штаммов бактерий – контроль посевных культур бактериальных штаммов-продуцентов:

- а) на чистоту;
- б) типичность биологических свойств;
- в) на отсутствие лизогении.

2. Подготовка маточных бактериофагов – контроль маточных бактериофагов:

- а) на содержание фаговых частиц в 1 мл, определяемое методом агаровых слоев по Грациа;
- б) на специфическую активность, определяемую титрованием в жидкой питательной среде по методу Аппельмана на посевных бактериальных штаммах;
- в) на стабильность лизиса (сохранность полученных результатов лизиса по методу Аппельмана) в течение 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- г) на стерильность.

В завершающей стадии культивирования в реакторах наступление полного фаголизиса определяют визуально по отсутствию видимого бактериального роста.

По мере завершения очистки фаголизатов методом ультрафильтрации, концентрирования и стерилизующей фильтрации проводится определение следующих показателей: рН, стерильность, специфическая активность по методу Аппельмана, аномальная токсичность.

При производстве комбинированных препаратов готовые монофаги соединяют в реакторах при соблюдении асептических условий.

Для получения жидкого препарата после финальной стадии бактериофаг разливают по флаконам и укупоривают.

Для получения препаратов в таблетках:

а) в концентрированный бактериофаг добавляют стабилизаторы и лиофилизируют. Сухую массу бактериофага контролируют в тестах на специфическую активность и микробиологическую чистоту;

б) после добавления наполнителей проводится таблетирование. В качестве вспомогательных веществ используют пектин, кальция глюконат, глюкозу, тальк, кальция стеарат. Таблетки проверяют на ломкость, отсутствие дефектов (сколов, расслоений), определяют среднюю массу таблеток;

в) после завершения фасовки таблеток готовый продукт контролируют по всем показателям: описание (внешний вид таблеток), подлинность и специфическая активность, средняя масса таблетки, распадаемость, потеря в массе при высушивании, микробиологическая чистота, аномальная токсичность.

К специфическим методам исследования, используемым для характеристики лечебно-профилактических бактериофагов, относятся методы Аппельмана и Грациа.

Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу Аппельмана

Специфическую активность бактериофагов и стабильность лизиса по методу Аппельмана определяют с использованием гомологичных тест-штаммов бактерий (контрольных штаммов). Показатели специфической активности указывают в фармакопейной статье. Контрольные штаммы отбирают из коллекции производственных штаммов бактерий. Они не должны использоваться при производстве данной серии препарата. Состав питательного бульона указывают в фармакопейной статье на определенный фаговый препарат.

Методика анализа

Испытания проводят с соблюдением правил асептики. В пробирках, содержащих по 4,5 мл питательного бульона (МПБ, бульона Хоттингера), готовят ряд последовательных десятикратных разведений бактериофага от

10^{-1} до 10^{-6} – 10^{-9} (в зависимости от показателей специфической активности, заложенных в фармакопейную статью на конкретный фаговый препарат) с обязательной сменой пипеток при каждом разведении. Для приготовления первого разведения добавляют 0,5 мл образца препарата к 4,5 мл бульона. В качестве контроля используют пробирку с 4,5 мл бульона без фага. После этого во все пробирки с полученными разведениями бактериофага пипеткой вносят по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий, содержащей 10^9 микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности (10 МЕ). Результаты учитывают через (18 ± 1) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Возможно изменение длительности инкубации в зависимости от видовых особенностей роста бактериальной мишени фагового препарата, о чем указывают в фармакопейной статье. Результат определяют по отсутствию видимого роста бактерий в присутствии бактериофага. Активность бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост контрольного штамма визуально не наблюдается. Для определения стабильности лизиса срок инкубации продлевают до 2 сут.

Определение фаговых частиц в 1 мл по методу Грациа (на плотных питательных средах двухслойным методом)

Мясопептонный 1,5 % агар разливают в чашки Петри по (20 ± 2) мл (первый слой). Перед использованием чашки с агаром подсушивают в перевернутом виде с прикрытой крышкой при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30–60 мин. Для титрации используют посевные штаммы бактерий. Готовят десятикратные последовательные разведения маточного фага в МПБ по методу Аппельмана от 10^{-1} до 10^{-8} (10^{-9} или выше, в зависимости от специфической направленности бактериофага). Затем смешивают 1 мл разведенного фага из пробирок с разведениями 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} разведений с 5 мл расплавленного и остуженного до температуры $45 ^\circ\text{C}$ 0,7 % мясопептонного агара. Затем добавляют $(0,2 \pm 0,05)$ мл 18-часовой бульонной

культуры посевного штамма, подготовленного из суточной культуры, выращенной на плотной питательной среде, в соответствии с требованиями к производственным бактериальным штаммам. Содержимое пробирок быстро перемешивают вращением пробирок между ладонями, чтобы не произошло застывания агара, и выливают вторым слоем на поверхность 1,5 % агара в чашках Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки инкубируют в течение 18 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Для определения концентрации фаговых частиц в маточном фаге подсчитывают количество негативных колоний (прозрачные пятна на матовом фоне глубинного роста бактерий) в каждой чашке, умножают на коэффициент разведения фага в пробирке с соответствующим разведением. Затем вычисляют среднее значение 3 определений.

Данная методика используется при отборе перспективных фаговых рас в коллекцию маточных бактериофагов. От вида бактериофагов зависит порядок применяемых в опыте разведений.

рН. Показатель рН фаголизата должен составлять от 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Очищенный и концентрированный фильтрат фаголизатов должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Введение мышам очищенного фильтрата фаголизатов не должно вызывать гибель животных. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза препарата бактериофага в объеме 1 мл вводится животным подкожно.

ИСПЫТАНИЯ

Проводят необходимые испытания, предусмотренные для лечебно-профилактических бактериофагов в соответствующей лекарственной форме.

Описание. Приводится описание физических свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного средства. Испытание проводят визуально.

Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью.

pH (для растворов) – от 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем (для растворов) – не должен быть менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Время распадаемости (для таблеток) не должно превышать 30 мин, если в фармакопейной статье на определенный фаговый препарат нет других указаний. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Бактериофаги, выпускаемые в виде кишечнорастворимых таблеток, не должны распадаться в течение 1 ч в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и после промывания водой должны распадаться в растворе натрия гидрокарбоната (рН от 7,5 до 8,0) в течение 30 мин.

Потеря в массе при высушивании (для таблеток) должна быть не более 4,0 %, если нет других указаний в фармакопейной статье. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды».

Стерильность (для растворов). Препарат должен быть стерильным (категория 5БП согласно ОФС «Микробиологическая чистота»). Испытание стерильности проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Микробиологическая чистота (для таблеток) должна соответствовать категории 5.2Б согласно ОФС «Микробиологическая чистота»:

- общее число непатогенных аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата (1 г);

- отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата (1 г);

- отсутствие энтеробактерий в единице препарата (1 г);

- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в единице препарата (1 г);

- отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата (1 г).

Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность. Введение мышам подкожно 1 мл препарата бактериофага не должно вызывать гибель животных. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Пробоподготовку препаратов указывают в фармакопейной статье на препарат.

Специфическая активность. Активность бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост контрольных штаммов бактерий визуально не наблюдается. Нормативные требования, в том числе количество используемых контрольных штаммов (не менее 10 штаммов для монопрепаратов), указывают в фармакопейной статье на препарат. Определение проводят титрованием в жидкой питательной среде по методу Аппельмана. Методику и подготовку проб указывают в фармакопейной статье на конкретный фаговый препарат.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С, допускается при температуре от 9 до 25 °С в пределах 1 мес.

Хранение. В сухом, защищенном от света и недоступном для детей месте, при температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие бифидобактерии (далее по тексту «бифидосодержащие пробиотики»).

Бифидосодержащие пробиотики содержат один или несколько видов живых бактерий рода *Bifidobacterium*, обладающих антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных бактерий, за счет продукции антибиотикоподобных веществ (бактериоцинов, микроцинов) и продуктов метаболизма (молочной, уксусной и других органических кислот).

Бифидосодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные* полученные на основе одного производственного штамма бактерий рода *Bifidobacterium* (например, штаммы бактерий *Bifidobacterium bifidum* 1, 791, ЛВА-3, *B.adolescentis* МС-42);
- *Поликомпонентные* полученные на основе нескольких производственных штаммов бифидобактерий или состоящие из бактерий, принадлежащих к различным родам и семействам (например, штаммы бактерий *B. bifidum* 1 и *Escherichia coli* М-17; *B.longum* ВВ-46 и *Enterococcus faecium* Cernelle SF 68), дополняющие или потенцирующие друг друга по

ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам;

- *Сорбированные* полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного или других сорбентах (например, бактерии штамма *B. bifidum* 1, сорбированные на угле);

- *Комбинированные* в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, действующие вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека (например, сочетание в препарате бактерий штамма *B. bifidum* 1 и лизоцима).

Производственные штаммы бактерий рода *Bifidobacterium*

Штаммы рода *Bifidobacterium*, используемые для производства бифидосодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Производственные штаммы рода *Bifidobacterium* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены молекулярно-генетическими методами.

Таблица 1– Производственные штаммы рода *Bifidobacterium*, используемые в производстве бифидосодержащих пробиотиков, зарегистрированных в РФ

Название производственного штамма бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	- Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), коллекционный номер штамма № 900791 - Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
<i>B. bifidum</i> 791	- ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-3300 - Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 80
<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	- ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-3299 - Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 81
<i>B. adolescentis</i> MC-42	- ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-1987 - Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора №210
<i>B. longum</i> В379М	- ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-2000 - Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
<i>B. longum</i> BB-46	Chr.Hansen Culture Collection, Дания, номер депозита – 15958
<i>B. longum</i> DSM 20219 или ATCC 15707 типа E194	- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSM (Германская коллекция микроорганизмов и культур клеток), номер депозита – DSM 20219 - American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур), номер депозита ATCC 15707 типа E194 - ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита – AC 1665

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Название штамма	Описание морфологических, тинкториальных и культуральных свойств
<i>B. bifidum</i> 1	В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные неподвижные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм с бифуркацией или утолщением на одном или двух концах, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 72 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ)– бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 44 — 48 ч. При посеве культуры, предварительно выращенной на печеночной среде Блаурокка или КД-5, в обезжиренное молоко в объеме 5 — 10 % при инкубации в течение 72 – 96 ч штамм <i>B. bifidum</i> 1 вызывает только закисление молока (до 40 – 50 °Т) без свертывания.
<i>B. bifidum</i> 791 и ЛВА-3	В мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться грамположительные неподвижные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм, которые располагаются в виде отдельных клеток или скоплений и имеют бифуркацию или утолщение на одном или обоих концах клетки. Строгие анаэробы; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образуют круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> ЛВА-3 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Отдельные колонии бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> 791 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму «комет» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Оптимальная температура роста для обоих штаммов $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16 –24 ч. При посеве каждого из штаммов, предварительно выращенных на печеночной среде Блаурокка или КД-5, в обезжиренное молоко в объеме 5 — 10 % после инкубации в течение 24 ч происходит сквашивание молока с образованием сгустка.
<i>B. adolescentis</i> MC-42	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть грамположительные неподвижные зернистые палочки прямые или изогнутые с утолщением или ветвлением на одном или двух концах длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые

	мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноз); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «зерен» или «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 56 – 72 ч.
<i>B. longum</i> B379M	В мазках, окрашенных по Граму, должны определяться грамположительные неподвижные полиморфные палочки с раздвоениями или булавовидными утолщениями на одном или двух концах длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноз); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют шаровидную форму белого цвета и образуют при встряхивании крошковатую массу. Штамм хорошо растет в обезжиренном молоке, образуя равномерный сгусток через 18 – 20 ч инкубации при $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16 – 20 ч.
<i>B. longum</i> BB-46	В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные неподвижные слабо или сильно набухшие, иногда деформированные палочки размером от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 48 – 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые прозрачные белые колонии 1 мм в диаметре. Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
<i>B. longum</i> DSM 20219	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть грамположительные неподвижные слабо или сильно набухшие, иногда деформированные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 48 – 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые белые прозрачные колонии 1 мм в диаметре. Оптимальная температура роста бифидобактерий $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Таблица 3– Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Свойства	Штаммы бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>					
	<i>B. bifidum</i>			<i>B. adolescentis</i> MC-42	<i>B. longum</i> B379M	<i>B. longum</i> BB-46 и DSM 20219
	1	791	ЛВА-3			
Ферментирует без образования газа:						
-глюкозу	+	+	+	+	+	+
-лактозу	+	+	+	+	+	+
-мальтозу				+	+	+
-маннозу	-	-	-	+	+	+
-целлобиозу	±	±	±	+ слабо	±	±
-сахарозу	+	+	+	+ медленно	+	+
-арабинозу	-	-	-	-	-	-
-ксилозу	-	-	-	-	-	-
-инулин	-	-	-	-	-	-
-сорбит	-	-	-	-	-	-
-салицин	-	-	-	-	-	-
Оптимальная температура для роста (38 ± 1) °C	+	+	+	+	+	+
Разжижает желатин	-	-	-	-	-	-
Сквашивает молоко	-	+	+	+		
Продуцирует каталазу	-	-	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-	-	-
Адгезивная активность	+	+	+	+	+	+
Активность кислотообразования при культивировании в печеночной среде Блаурокка °T	100	100	100	не ниже 120	не ниже 120	100
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов в мм на среде МРС-5 в анаэробных условиях)	не менее 15	не менее 10	15	не менее 20	не менее 15	не менее 10

Примечание: «+» положительный; «-» отрицательный; «+/-»-замедленно положительный

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Штамм бактерий	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводимая доза, $\times 10^{10}$ КОЕ/0,5 мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, $\times 10^9$ КОЕ/0,5 мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/павших мышей
<i>B. bifidum</i> 1, 791 и ЛВА-3	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>B. adolescentis</i> MC-42	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>B. longum</i> B379M	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>B. longum</i> BB-46 и DSM 20219	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		

ПРОИЗВОДСТВО

Производство бифидосодержащих пробиотиков основано на культивировании производственного штамма (или штаммов) бактерий рода *Bifidobacterium* методом глубинного культивирования в оптимальной питательной среде с соблюдением определенных технологических параметров, обеспечивающих оптимальные условия для накопления биомассы бифидобактерий и сохранения их пробиотических свойств; последующая стадия производства пробиотиков – лиофилизация биомассы в защитной среде.

При производстве бифидосодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества лекарственных средств доказывают, что конкретная методика, процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность или система действительно приводят к ожидаемым и повторяемым результатам, и гарантируют, что лекарственное средство изготовлено в соответствии со

своим составом, не содержит контаминантов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

При производстве бифидосодержащих пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, осуществляется контроль качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Бифидосодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизат, капсулы, таблетки, суппозитории и порошки.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственной формы таблетки оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки», «Капсулы», «Суппозитории» и «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства и, при необходимости, органолептических свойств.

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму), культурально-морфологическим (описание вида колоний выросших на адекватных питательных средах) и/или бактериологическим (подтверждается специфической биологической активностью). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов, порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата

(для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, перемешивание, встряхивание, использование дисков и пр.)

Время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Температура плавления или время полной деформации (для суппозиторий). Для суппозиторий, изготовленных на липофильной основе, определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиторий на липофильной основе».

Указывают применяемый растворитель, его объем, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание, использование водяной бани).

При проведении теста «Температура плавления» или «Время полной деформации» учитывают, что время расплавления для суппозиторий и мазей должно быть не более 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

pH (для лиофилизатов, порошков, капсул и таблеток). Указывается допустимый интервал значений pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». В случае определения pH после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации) для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, порошков, суппозиторий и содержимого капсул). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля (порода/линия, пол), их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения; учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Бифидосодержащие пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

- категория 5.3.А (лиофилизаты, порошки);
- категория 5.3.Б (таблетки, капсулы, суппозитории).

В нормативных документах на пробиотики для детей введены более строгие нормы, а именно:

- для детей (от 3 мес до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 10 аэробных бактерий в 1 единице препарата/в г; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и дрожжевых и плесневых грибов;
- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы), ректально (суппозитории) – не более 50 аэробных бактерий в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов.

Указывают используемые питательные среды, количество и объем испытуемого материала, условия инкубации и ее продолжительность, учет результатов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и активностью кислотообразования (или антагонистической активностью) в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

В 1 дозе препарата должно содержаться (если нет других указаний в нормативной документации) не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий.

Активность кислотообразования штамма-продуцента, входящего в испытуемый препарат, должна быть не менее 100 °Т (если нет других указаний в нормативной документации).

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе препарата бифидосодержащих пробиотиков проводят методом серийных разведений в полужидкой модифицированной печеночной среде Блаурокка (если в нормативной документации не приведены другие среды) с последующей инкубацией в адекватных условиях. При проведении контроля поликомпонентных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат.

Кислотообразующую активность штаммов-продуцентов, входящих в состав бифидосодержащих пробиотиков, определяют по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Количественное определение кислотообразующей активности проводят методом кислотно-основного титрования.

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим и биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет иных указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного препарата.

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) – вакцины и анатоксины, содержащие компоненты, вызывающие при введении человеку активный специфический иммунный ответ к антигенам микроорганизмов, включая микробные токсины. Активными компонентами могут являться:

- живые микроорганизмы (авирулентные или аттенуированные);
- микроорганизмы, инаktivированные физическим или химическим способом;
- антигены, выделяемые микроорганизмами или извлеченные из них, а также полученные по технологии синтеза или методами генной инженерии.

Антигены могут быть использованы в нативном состоянии или после детоксикации химическими и/или физическими методами. С целью повышения иммуногенности они могут быть агрегированы, полимеризованы или конъюгированы с носителем или адсорбированы на последнем.

Вакцины и анатоксины, наряду с одним или несколькими активными антигенными компонентами, могут содержать вспомогательные вещества. К вспомогательным компонентам относятся вещества органического или неорганического происхождения (адъюванты, консерванты, стабилизаторы и т.п.), вносимые в препараты для придания им определенных физико-

химических и/или биологических свойств. Их наличие и количество должно быть отражено в нормативной документации производителя. В качестве вспомогательных веществ могут быть использованы только вещества, безопасность и эффективность которых при соответствующем пути введения установлена.

Вакцины выпускают в следующих лекарственных формах: растворы или суспензии (для инъекций или приема внутрь); лиофилизаты для приготовления растворов или суспензии для инъекций; таблетки.

Бактериальные вакцины содержат живые и/или инаktivированные бактерии или их антигенные компоненты, количество которых в единице объема или в прививочной дозе определяют методом прямого подсчета или выражают в Международных Единицах мутности (МЕ).

Вирусные вакцины представляют собой инаktivированные или живые вирусы или антигенные компоненты вирусов. Для получения инаktivированных вирусных вакцин (цельновирioнных, расщепленных, субъединичных) могут быть использованы как вирулентные, так и аттенуированные штаммы. Отсутствие нейровирулентности штамма должно быть продемонстрировано наиболее чувствительными методами. Активными компонентами вирусных вакцин могут служить рекомбинантные антигены, полученные методами генной инженерии, а также синтетические антигены, полученные методом химического синтеза.

Размножение вируса может быть осуществлено на куриных или перепелиных эмбрионах, а также с использованием линий диплоидных клеток, культур первичных и перевиваемых клеток животных или человека, клеток насекомых и других.

Содержание вирусных частиц в живых вакцинах выражают в ТЦД₅₀ (тканевые цитопатогенные дозы), ООЕ (оспообразующие единицы), БОЕ₅₀ (бляшкообразующие единицы), ЭИД₅₀ (эмбрионинфицирующие дозы) и других единицах.

Для получения живых вакцин используют штаммы со стабильно закрепленными авирулентными свойствами.

Вакцины могут быть сорбированными, конъюгированными и несорбированными.

Анатоксины представляют собой полностью обезвреженные бактериальные экзотоксины, обладающие высокой иммуногенностью. Детоксикация токсинов, проводимая химическими и/или физическими методами, должна обеспечивать сохранение их антигенной активности и гарантировать отсутствие реверсии токсических свойств.

Анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей методами, обеспечивающими сохранность их антигенных свойств. Для повышения иммуногенности анатоксины адсорбируют на адьювантах – как правило, на алюминия гидроксиде. Количество анатоксина в единице объема или в прививочной дозе выражают в единицах массы или установленных Международных единицах (флокулирующие единицы – Lf, единицы связывания – ЕС и др.). Специфическую (иммуногенную) активность анатоксинов в составе адсорбированных вакцин выражают в МЕ (международных единицах).

Жидкие лекарственные формы адсорбированных вакцин и анатоксинов не должны содержать неразбивающихся частиц.

ПРОИЗВОДСТВО

Общие требования

Все этапы производства вакцин и анатоксинов должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих их качество и безопасность применения.

При производстве вакцин и анатоксинов используются рабочие посевные серии микроорганизмов, которые должны обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого получена исходная посевная серия. Штаммы микроорганизмов, используемые как исходная посевная

серия, должны быть идентифицированы и охарактеризованы, включая информацию о происхождении.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств вакцинных штаммов, безопасность препарата и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Питательные среды для культивирования вакцинных штаммов не должны содержать ингредиентов, вызывающих токсические, аллергические или другие нежелательные реакции у людей. При необходимости использования таких ингредиентов следует продемонстрировать, что их количество в конечном продукте ниже уровня, гарантирующего безопасность для человека.

Животных, используемых при производстве и испытаниях, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионных и других заболеваний, опасных для человека.

При испытаниях на лабораторных животных следует учитывать положения Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей: испытания должны выполняться так, чтобы использовать минимальное количество животных и причинять им наименьшие боль, страдания и вред.

Культуры клеток

Культуры клеток, используемые для получения вакцин, должны быть аттестованы, депонированы в государственных коллекциях и разрешены к применению для вышеуказанных целей уполномоченным органом и соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов».

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека, а также пенициллина и стрептомицина. При необходимости применения других антибиотиков их следует применять в

минимально эффективной концентрации. В культуральных средах допустимо наличие индикатора pH, например, фенолового красного.

Куриные или перепелиные эмбрионы, используемые для производства, получают только от здоровой птицы из птицев хозяйств, благополучных по инфекционной заболеваемости птиц; качество поставляемых эмбрионов подтверждается документами ветеринарной службы о санитарном состоянии поголовья. При инкубации эмбрионов, используемых при размножении вируса, не менее 2 % незараженных эмбрионов инкубируют параллельно с зараженными эмбрионами в качестве контроля на отсутствие контаминирующих вирусов.

При работе с культурами патогенных микробов и токсинами биологической природы следует соблюдать действующие санитарно-эпидемиологические правила.

Адсорбенты

Вакцины и анатоксины могут быть адсорбированы на алюминия гидроксиде, алюминия фосфате, кальция фосфате или других подходящих адсорбентах, безопасность и эффективность которых при соответствующем пути введения установлена.

В процессе производства адсорбированных вакцин и анатоксинов используют валидированный метод адсорбции антигена, обеспечивающий регламентированную полноту сорбции на протяжении всего срока годности ИЛП. Количество и сорбционная емкость адсорбента должны обеспечивать максимально возможную сорбцию антигена и ее стабильность.

Полноту сорбции определяют путем индикации антигена (антигенов) в надосадочной жидкости вакцин и анатоксинов, используя биологические, иммунологические и иммунохимические методы.

Консерванты

Антимикробные консерванты рекомендуется использовать при производстве адсорбированных лекарственных препаратов и препаратов, выпускаемых в многодозной расфасовке. Не рекомендуется использование

консервантов при производстве лиофилизированных лекарственных препаратов и препаратов, выпускаемых в однократной расфасовке.

Показатели, которые существенно влияют на качество конечного продукта, но не могут быть выявлены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, о чем указывается в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание лекарственного препарата в соответствии с требованиями ОФС к используемой лекарственной форме.

pH. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Испытания жидких лекарственных форм проводят с неразведенным препаратом; лиофилизированных форм – с препаратом, растворенным в прилагаемом растворителе, а при его отсутствии – в растворителе, предусмотренном инструкцией по применению.

Потеря в массе при высушивании и определение воды. Потеря в массе при высушивании не более 3,0 % для лиофилизированных вакцин, если нет других указаний в нормативной документации. Для таблетированных лекарственных форм – не более 4,0 % при условии стабильного сохранения всех основных свойств на протяжении срока годности. В нормативной документации указывают метод определения для всех лекарственных форм.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» и/или ОФС «Определение воды».

Химические показатели. При необходимости указывают требования к количественному содержанию белка, нуклеиновых кислот, полисахаридов и др. и описывают метод их количественного определения (в случае, если они не подлежат включению в раздел «Специфическая активность»).

Стерильность. Инактивированные вакцины и анатоксины для инъекций должны быть стерильными. Испытание проводят в соответствии с

ОФС «Стерильность». Для живых бактериальных вакцин раздел «Стерильность» заменяют разделом «Отсутствие посторонних микроорганизмов». В нормативной документации указывают требования и методы определения. При необходимости проведения контроля на отсутствие микоплазм данный подраздел помещают после описания контроля на стерильность, не выделяя его в заголовке.

Микробиологическая чистота. Для неинъекционных лекарственных форм и живых вакцин указывают максимально допустимую контаминацию препарата и перечень видов микроорганизмов, наличие которых недопустимо. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Нормативные требования указывают в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины». Для препаратов, вводимых парентерально, которые не содержат в своем составе эндотоксины, указывают метод определения, пробоподготовку и тест-дозу препарата, допустимые условия определения (величина допустимых показателей температуры тела животных или содержание бактериальных эндотоксинов в соответствующих единицах).

Специфическая безопасность. Указывают нормативные требования и приводят описание методов *in vivo* и/или *in vitro*, позволяющих оценить полноту инаktivации (для инаktivированных вакцин), допустимую остаточную вирулентность микроорганизмов (для живых вакцин) или отсутствие экзотоксинов (для анатоксинов).

Аномальная токсичность. Приводят нормативные требования и описывают методы, позволяющие доказать отсутствие в препарате токсических веществ, с указанием вида животных, тест-дозы, способа введения препарата, времени наблюдения и критериев приемлемости результатов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Указывают требования к специфической активности и методы ее количественной оценки *in vivo* и/или *in vitro* (например, количественное содержание антигена, количественное содержание живых микроорганизмов в единице объема или прививочной дозе, антигенная активность, иммуногенные свойства и др.). Выбор применяемых методик определяется видом препарата. При исследованиях на животных указывают их вид, породу/линию, количество, массу тела, возраст, пол. Описывают пробоподготовку, дозы, схемы и методы введения испытуемых препаратов и стандартных образцов (в случае использования), методы оценки результатов и расчета, требования к результатам испытания. При использовании тест-штаммов приводят их наименование и название коллекции, тест-дозу и способ введения.

В случае, если предусмотрено применение эмбрионов птиц, приводят требования к их возрасту; при использовании культур клеток – их наименование.

Специфическая активность и реактогенность в наблюдении на людях. В случае, если предусмотрено проведение испытаний на ограниченной группе людей, раздел должен содержать сведения о периодичности проводимых исследований, характеристику контингента (пол, возраст, при необходимости – иммунологические показатели), дозу, схему и метод введения препарата, учитываемые показатели (клинические, серологические), методы оценки результатов и требования к результатам испытаний.

Полнота сорбции. Содержание неадсорбированных антигенов в надосадочной жидкости адсорбированных вакцин не должно превышать 1%, если в нет других указаний в нормативной документации. Приводят описание методики определения содержания неадсорбированных антигенов в надосадочной жидкости адсорбированных вакцин.

Производственные штаммы микроорганизмов и штаммы для контроля. Раздел должен содержать следующую информацию:

наименование штаммов (на латинском языке в соответствии с международной номенклатурой) и место их депонирования; допустимое количество пассажей и условие их проведения (при необходимости) с указанием субстрата для культивирования; при необходимости – требования к характеристикам штаммов, дополнительные к их паспортным данным.

Консерванты. При использовании консервантов их концентрация не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать значение, указанное на упаковке препарата, более чем на 15 % .

При использовании антимикробного консерванта – тиомерсала, определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Свободный формальдегид. Не более 0,2 г/л. В препаратах для детей не более 0,1 г/л, если при приготовлении вакцин и анатоксинов использовался формальдегид. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Фенол. Не более 2,5 г/л, если при приготовлении вакцин и анатоксинов использовался фенол. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

В препаратах, содержащих дифтерийный и столбнячный анатоксины, а также коклюшную суспензию, присутствие фенола не допускается.

Алюминий. Не более 1,25 мг алюминия(III) на дозу, если при приготовлении использовался адсорбент, содержащий алюминий, и если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Кальций. Не более 1,3 мг кальция(II) на дозу, при использовании адсорбента, содержащего кальций, если в нормативной документации нет иных указаний. Приводят описание методики определения.

Извлекаемый объем. Указывают нормативные требования. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. В качестве растворителей для лиофилизированных препаратов используют средства, разрешенные к медицинскому применению при соответствующем пути введения. Указывают вид растворителя и требования к его качеству.

Упаковка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Для выпуска препарата в многодозовой упаковке не рекомендуется использовать ампулы.

Транспортирование. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». В разделе указывают документ, регламентирующий условия и температуру транспортирования; при необходимости указывают продолжительность транспортирования при температуре, отличающейся от указанной в нормативной документации. Жидкие адсорбированные вакцины и анатоксины должны транспортироваться в условиях, исключающих замораживание.

Хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». В разделе указывают регламентированные условия хранения, в первую очередь – температуру хранения, обеспечивающую сохранение активности препарата в течение заявленного срока годности. Если нет иных указаний, температура хранения должна находиться в пределах от 2 до 8 °С. Жидкие вакцины и анатоксины должны храниться в условиях, исключающих замораживание.

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие кишечную палочку (далее по тексту – «колисодержащие пробиотики»).

Колисодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых антагонистически активных штаммов кишечной палочки, лиофильно высушенную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания.

Колисодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, – полученные на основе одного производственного штамма кишечной палочки (например, *Escherichia coli* М-17);
- *Поликомпонентные*, – полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий, принадлежащих к разным родам и семействам (например, *Escherichia coli* М-17 и *Bifidobacterium bifidum* 1), дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

Производственные штаммы бактерий *Escherichia coli*

Штаммы бактерий *E. coli*, используемые для производства колисодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Таблица 1 – Производственные штаммы бактерий *E. coli*, используемые в производстве колисодержащих пробиотиков, зарегистрированных в РФ

Название производственного штамма бактерий <i>Escherichia coli</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>E. coli</i> M-17	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 240418
<i>E. coli</i> Г-35-1/59	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790059
<i>E. coli</i> Г-35-1/60	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790060
<i>E. coli</i> Г-35-1/61	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790061

Производственные штаммы бактерий *E. coli* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии.

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий *E. coli*

Название штамма	Описание морфологических и культуральных свойств
<i>E.coli M-17</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться подвижные грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на мясопептонном агаре образует бесцветные круглые с ровными краями выпуклые колонии; на среде Эндо образует красные колонии с зеленоватым металлическим блеском; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$
<i>E. coli Г-35-1/59</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром $(2,0 \pm 0,5)$ мм с ровными краями; на среде Эндо образует красные колонии без металлического блеска; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$
<i>E. coli Г-35-1/60</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром $(2,0 \pm 0,5)$ мм с ровными краями; на среде Эндо образует красные колонии с металлическим блеском; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$
<i>E. coli Г-35-1/61</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны определяться подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром $(2,0 \pm 0,5)$ мм с ровными краями; на среде Эндо образует светло-красные колонии без металлического блеска; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий *E. coli*

Свойства	Штаммы бактерий вида <i>Escherichia coli</i>			
	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Г-35-1/59	<i>E. coli</i> Г-35-1/60	<i>E. coli</i> Г-35-1/61
Ферментирует:				
сорбит	+	+	+	+
арабинозу	+	+	+	+
лизин	+	+	+	+
сахарозу	+	+	+/-	-
инозит	-	-	-	-
Ферментирует с образованием кислоты и газа:				
глюкозу	+	+	+	+
лактозу	+	+	+/-	+
мальтозу	+	+	+	+
маннит	+	+	+	+
Образует:				
индол	+	+	+	+
сероводород	-	-	-	-
Разжижает желатин	-	-	-	-
Гидролизует мочевины	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-
Адгезивная активность	+	+	+	+
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов на агаризованной среде Гаузе №2, мм)	не менее 10	не менее 10	не менее 10	не менее 10

Примечание: «+» положительный; «-» отрицательный; «+/-» замедленно положительный.

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий *E. coli*

№ штамма	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводимая доза живых <i>E.coli</i> , $\times 10^{10}$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза живых <i>E.coli</i> , $\times 10^9$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза инактивированных <i>E. coli</i> , $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
<i>E. coli</i> M-17	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5	0,5	10/0
	10	10/0	1	10/0	1	10/0		
<i>E. coli</i> Г-35-1/59	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5	0,5	10/0
	10	10/0	1	10/0	1	10/0		
<i>E. coli</i> Г-35-1/60	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5	0,5	10/0
	10	10/0	1	10/0	1	10/0		
<i>E. coli</i> Г-35-1/51	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5	0,5	10/0
	10	10/0	1	10/0	1	10/0		

ПРОИЗВОДСТВО

Производство колисодержащих пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма бактерий *E. coli* на оптимальной питательной среде в соответствующих условиях методом глубинного культивирования с последующей лиофилизацией биомассы в защитной среде.

При производстве колисодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества ИЛП доказывают, что производственный процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность персонала, конкретная методика действительно приводят к ожидаемым результатам и гарантируют, что лекарственное средство изготовлено в соответствии со своим составом, не содержит контаминантов и бактериофагов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

При производстве колисодержащих пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, осуществляется контроль качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Колисодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), таблетки, порошки. Показатели качества лекарственного средства оценивают по соответствующей лекарственной форме.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственных форм таблетки, порошки и лиофилизаты оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки» и «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму), бактериологическим (описание вида колоний, выросших на адекватных питательных средах, и подтверждается специфической активностью). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов и порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата (для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Указывают время, необходимое для растворения лекарственного препарата, применяемый растворитель (среда восстановления), его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание).

Время распадаемости (для таблеток). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Указывают время, необходимое для растворения лекарственного препарата, применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание).

Время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывают допустимый интервал значений pH (в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель и его объем).

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом. Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации) для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток и порошков). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются

требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля (порода/линия, пол), их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения и учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева. Колисодержащие пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

Категория 5.3.А (лиофилизаты, порошки)

- отсутствие бактерий-контаминантов в единице препарата, г/мл;
- отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата, г/мл;
- для монокомпонентных препаратов – не более 10 БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл;
- для поликомпонентных препаратов – отсутствие БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл.

Категория 5.3.Б (таблетки)

- общее число аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата, г;
- общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в единице препарата, г;
- отсутствие энтеробактерий в единице препарата, г;
- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в единице препарата, г;
- отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата, г;
- для монокомпонентных препаратов – не более 10 БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл;

- для поликомпонентных препаратов – отсутствие БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл.

Указывают используемые питательные среды, количество и объем испытуемого материала, условия инкубации и ее продолжительность, правила учета результатов.

Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам микроорганизмов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованные питательные среды (агар Эндо или мясопептонный агар, если в нормативной документации не приведены другие среды). При проведении контроля поликомпонентных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат. В одной дозе монокомпонентного препарата *E. coli* должно содержаться не менее $6 \cdot 10^9$ КОЕ, если в нормативной документации не приведены другие требования.

Антагонистическая активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяется методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе № 2 или на полусинтетической среде с дрожжевым диализатом (если в нормативной документации не приведены другие среды) по зонам задержки роста тест-штаммов. Зоны задержки роста тест-штаммов условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов рода *Candida* должны быть не менее 10 мм, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться следующая информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим и биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие лактобактерии (далее по тексту «лактосодержащие пробиотики»).

Лактосодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий рода *Lactobacillus*, лиофильно высушенную в защитной среде (сахарозо-желатиновой, сахарозо-желатино-молочной или иной).

Лактосодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, – полученные на основе одного производственного штамма лактобактерий (например, *L.plantarum* 8P-A3 или *L.acidophilus* La CH-2);
- *Поликомпонентные*, – полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащих к одному виду (например, *L.acidophilus* 100аш, *L.acidophilus* NK и *L.acidophilus* К₃Ш₂₄) или к разным видам (например, *L.plantarum* и *L.acidophilus*), или на основе нескольких производственных штаммов бактерий разных родов или семейств (например, *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 и *Bifidobacterium bifidum* 1), дополняющих или потенцирующих друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

- *Комбинированные*, – полученные на основе одного или нескольких производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, или на основе нескольких производственных штаммов бактерий разных родов или семейств и содержащие, помимо живых микроорганизмов-представителей нормофлоры, другие активные компоненты (например, *L.fermentum* 90Т-С4, *B. bifidum* 1 и Силимар экстракт сухой или *L.rhamnosus*, витамины и микроэлементы).

Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus*

Штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, используемые для производства лактосодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Таблица 1– Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, используемые в производстве лактосодержащих пробиотиков в РФ

Название производственного штамма бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>L.acidophilus</i> 100аш	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3190
<i>Lacidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3090
<i>Lacidophilus</i> NK ₁	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8957 (В центральной лаборатории ВНИМИ № 22/10)
<i>Lacidophilus</i> NK ₂	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8958
<i>L.acidophilus</i> NK ₅	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8959
<i>Lacidophilus</i> NK ₁₂	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8960
<i>L.plantarum</i> 8Р-А3	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900811
<i>Lfermentum</i> 90Т-С4	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900812
<i>Lplantarum</i> 7-19 (38)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), №790038
<i>L.fermentum</i> 1-20 (39)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), №790039

Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и ОФС «Безопасность пробиотиков *in vivo*».

Штаммы ацидофильных лактобацилл среднеустойчивы к колистину, триметоприму, азтреонаму, канамицину, суфадиазину, норфлоксацину. Они чувствительны к антибиотикам группы цефалоспоринов.

Таблица 2–Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Название штамма	Описание морфологических и культуральных свойств
<i>L.acidophilus</i> 100аш <i>L.acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2 – 4 и более клеток. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S и R-форме. Размер клеток 18-часовой культуры, выращенной в молоке, составляет 10–20 мкм. Клетки равномерно окрашиваются метиленовой синью. При выращивании на агаре с гидролизованным молоком через 48–72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний – 1–2 мм. Штаммы обладают высокой активностью свертывания молока. При оптимальной для роста температуре и внесении 3–5% посевного материала должны свертывать молоко за 1–12 ч, снижая pH молока до уровня 3,8 – 4,2.
<i>L.acidophilus</i> NK ₁ <i>Lacidophilus</i> NK ₂ <i>L.acidophilus</i> NK ₅ <i>L.acidophilus</i> NK ₁₂	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы; растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2–4 и более клеток или поодиночке. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S- и R-форме. Величина клеток 18-часовой культуры в молоке составляет 10–20 мкм. Клетки равномерно окрашиваются по Граму. При выращивании на агаре с гидролизованным молоком через 48–72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний – 1–2 мм. При культивировании на среде MPC-5 в анаэробных или микроаэрофильных условиях через 48–72 ч штаммы образуют круглые без четких границ колонии.
<i>L.plantarum</i> 8P-A3 <i>L.plantarum</i> 7-19	Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде MPC-1

	вырастают в виде равномерной мути и гомогенного белого осадка на дне пробирки; на полужидкой среде МРС-2 образуют изолированные колонии в виде тяжей. На плотной среде МРС-4 образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии
<i>L.fermentum</i> 90T-C4 <i>L.fermentum</i> 1-20	Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде МРС-1 дают равномерное помутнение и образуют гомогенный белый осадок на дне пробирки; на полужидкой среде МРС-2 образуют изолированные колонии в виде тяжей. На плотной среде МРС-4 образуют слабовыпуклые, полупрозрачные, сероватые колонии

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Свойства	Штаммы бактерий рода <i>Lactobacillus</i>			
	<i>L.acidophilus</i> 100аш, K ₃ Ш ₂₄	<i>L.acidophilus</i> NK ₁ , NK ₂ NK ₅ , NK ₁₂	<i>L. plantarum</i> 8P-A3, 7-19	<i>L.fermentum</i> 90T-C4, 1-20
Ферментация:				
- глюкоза	+	+	+	+
- лактоза	+	+	+	+
- галактоза	+	+	+	+
- манноза	+	+	+	+
- декстроза	+	+	+	+
- фруктоза	+	+	+	+
- мальтоза	+	+	+	+
- сахароза	+	+	+	+
- целлобиоза	+	+	+	В
- салицин	+	+	+	-
- маннит	-	-	+	-
- рамноза	-	-	-	-
- ксилоза	-	-	В	В
- сорбит	-	-	+	-
- арабиноза	-	-	В	В
- эскулин	+	+	+	-
- меллибиоза	+	В	+	+
- трегалоза	В	В	+	В
- мелецитоза	-	-	В	-
Образование газа из глюкозы	-	-	-	+
Образование кислоты из глюкозы	+	+	+	+
Каталаза	-	-	-	-
Лизоцимная активность	±	±	-	+
Оптимальная температура роста, °C	(38±1)	(38±1)	(37±1)	(37±1)
Рост при температуре 61 °C	+	+	±	±
Рост при температуре 20 °C	+	+	+	+
Рост при температуре 15 °C	-	-	+	-
Сквашивание молока	+	+	+	+
	L(+)-DL-молочная кислота	L(+)-DL-молочная кислота		

Рост в щелочной среде (pH=8)	+	+	±	±
Рост в присутствии 0,4–0,6 % растворе фенола	+	+	±	±
Рост в присутствии солей желчи (до 20 %)	+	+	±	±
Рост в 2% растворе NaCl	+	+	±	±
Адгезивная активность	-	-	+	+
Активность кислотообразования, °Т	не ниже 230	не ниже 230	не ниже 230	не ниже 230
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест- штаммов, мм)	не менее 20	не менее 20	не менее 20	не менее 20

Примечание: «+» положительный тест; «-» отрицательный тест

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Название микроорганизма (род, штамм)	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводи- мая доза, х10 ¹⁰ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, х10 ⁹ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, х10 ⁹ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, мл	Кол- во живы х/ павши х мыш е й
<i>L. acidophilus</i> 100аш К ₃ Ш ₂₄ NK ₁ NK ₂ NK ₅ NK ₁₂	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>L. plantarum</i> 8P-A3,7-19 (38)	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0
<i>L. fermentum</i> 90T-C4, 1-20 (39)	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лактосодержащих пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма или штаммов бактерий рода *Lactobacillus* на оптимальной питательной среде в адекватных условиях методом глубинного культивирования с последующей лиофилизацией биомассы в защитной среде.

При производстве лактосодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с

требованиями правил организации производства и контроля качества лекарственных средств доказывают, что конкретная методика, процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность персонала или система действительно приводят к ожидаемым результатам и гарантируют, что лекарственное средство соответствует своему составу, не содержит контаминантов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

При производстве лактосодержащих пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества для оценки их воспроизводимости и анализа качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Лактосодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), порошки, таблетки, капсулы (пероральные, вагинальные, капсула в капсуле), суппозитории и мази. Показатели качества лекарственного средства оценивают в соответствии с лекарственной формой.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственных форм лиофилизаты, таблетки и капсулы, порошки, суппозитории и мази оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки» и «Капсулы», «Порошки», «Суппозитории» и «Мази».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму), бактериологическим (описание вида колоний, выросших на адекватных питательных средах, и подтверждается специфической активностью). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы

для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов и порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата (для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание, использование водяной бани).

Время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Температура плавления или время полной деформации (для суппозиторий и мазей). Для суппозиторий, изготовленных на липофильной основе, определяют температуру плавления в соответствии с ОФС «Суппозитории», «Мази» и «Температура плавления» (метод 2), которая не должна превышать температуру 37 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации.

Для суппозиторий на липофильной основе определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиторий на липофильной основе». Время полной деформации не должно превышать 20 мин, если нет других указаний в нормативной документации.

рН (для лиофилизатов, порошков, капсул, таблеток). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС

«Ионометрия». Указывается допустимый интервал значений рН; в случае определения рН после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизатов, капсул, таблеток). Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации) для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для порошков, таблеток, содержимого капсул, суппозиторий и мазей). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля (порода/линия, пол), их количество, групповая масса животных перед введением препарата и после окончания срока наблюдения; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения и учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение возможной контаминации испытуемого препарата проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева. Лактосодержащие

пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

- категории 5.3.А (лиофилизаты, порошки);
- категории 5.3.Б (таблетки, капсулы, суппозитории, мази*).

* Дополнительно для лекарственной формы мази: в единице препарата (г) должны отсутствовать представители рода *Bacillus*.

В нормативных документах на пробиотики для детей введены более строгие нормы, а именно:

- для детей (от 3 мес до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 10 аэробных бактерий в 1 единице препарата/г; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов;
- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы), ректально (суппозитории) – не более 50 аэробных бактерий в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов.

Указывают используемые питательные среды, количество и объем испытуемого материала, условия инкубации и ее продолжительность, особенности учета результатов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и активностью кислотообразования (или антагонистической активностью) в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

В 1 дозе (таблетке, капсуле и т.д.) препарата должно содержаться:

- лактобактерий вида *L.acidophilus* – не менее 10^7 КОЕ;
- лактобактерий вида *L.plantarum* – не менее 10^9 КОЕ.

Активность кислотообразования штамма-продуцента, входящего в испытуемый препарат, должна быть не менее 220°Т (если нет других указаний в нормативной документации).

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим и биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

**Лекарственные средства, получаемые
методами рекомбинантных ДНК**

**ОФС.1.7.1.0007.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования к лекарственным средствам, получаемым с использованием методов рекомбинантной ДНК на основе стабильно экспрессирующей конструкции, включая особенности их производства.

Фармацевтические субстанции указанных лекарственных средств (биологические фармацевтические субстанции) получают с помощью культур охарактеризованных клеток, используемых в качестве систем экспрессии, которыми могут быть бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих и др. Полученные субстанции, являясь действующим веществом лекарственных средств, представляют собой белки и пептиды, а также их производные. К таким лекарственным средствам относятся цитокины, моноклональные антитела, вакцины с использованием рекомбинантных белков (HBsAg, белки вируса папилломы и др.), факторы плазмы крови человека, рецепторы клеток и другие рекомбинантные белки. Требования к конкретной фармацевтической субстанции и лекарственным препаратам на их основе изложены в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации.

Общая фармакопейная статья не распространяется на модифицированные клетки и микроорганизмы (например, живые вакцины), ДНК-вакцины, препараты для генной терапии.

Требования, приведенные в настоящей фармакопейной статье, могут быть дополнены в конкретной фармакопейной статье или нормативной

документации с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Клетки хозяина – клетки микроорганизмов или эукариотических клеточных линий, используемые для получения продукта, до внесения в них вектора.

Штамм-продуцент – комплекс клетки хозяина и вектора.

Вектор – агент трансмиссии, переносящий генетическую информацию от одной клетки к другой, например плазмиды, вирусные векторы.

Экспрессирующая конструкция – вектор, который содержит кодирующую последовательность рекомбинантного белка и элементы, необходимые для его экспрессии.

Сайт интеграции – участок генома клетки-хозяина, в который включаются одна или более копий экспрессирующей конструкции.

Значимые генотипические и фенотипические маркеры – маркеры, позволяющие идентифицировать штамм/клеточную линию и наличие экспрессирующей конструкции.

Фланкирующие регуляторные участки – некодирующие нуклеотидные последовательности, примыкающие к 5'- и 3'-концам кодирующей последовательности гена, которые содержат важные элементы, влияющие на транскрипцию, трансляцию или стабильность кодирующей последовательности. Эти участки включают, например, промотор, энхансер и последовательности для сплайсинга и не включают точки начала репликации и гены устойчивости к антибиотикам.

Главный банк клеток (ГБК) – гомогенная суспензия клеток хозяина, трансформированных экспрессионным вектором. Суспензию разливают в равных объемах в контейнеры, замораживают и хранят при условиях, обеспечивающих их стабильность. ГБК получают в установленных условиях из отобранного клеточного клона, содержащего экспрессирующую конструкцию.

Рабочий банк клеток (РБК) – гомогенная суспензия клеток, полученных на определенном уровне пассажа культивированием клеток из одного или более контейнеров ГБК, разлитая в равных объемах в контейнеры с целью хранения в условиях, обеспечивающих их стабильность. РБК используют для производства каждой серии готового продукта. Образцы рабочего банка клеток необходимо хранить, как минимум, до истечения срока годности последней выпущенной партии препарата.

Биологическая фармацевтическая субстанция – фармацевтическая субстанция, произведенная с использованием биологического источника, которая должна быть охарактеризована с использованием физических, химических и биологических испытаний и качество которой определяется этими испытаниями в сочетании с контролем процессов ее производства.

Конечный балк биологической фармацевтической субстанции для хранения (конечный балк) – биологическая фармацевтическая субстанция, полученная в непрерывном цикле производства, используемая для приготовления готовой лекарственной формы и предназначенная для хранения. Формирование серии конечного балка должно быть установлено и документировано производителем.

Очищенный белок – белок, полученный после завершения последней стадии очистки технологического процесса производства до добавления стабилизаторов и вспомогательных веществ, и предназначенный для дальнейшего производства лекарственного препарата.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Производство лекарственных средств, получаемых с использованием методов рекомбинантной ДНК, должно быть основано на системе серий посевного материала (системе банков клеток), в которой используются Главный банк клеток (ГБК) и Рабочий банк клеток (РБК).

Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы и

соответствовать требованиям микробиологической и вирусной безопасности в соответствии с ОФС «Требования к клеточным культурам-субстратам производства ИЛП».

Все этапы процесса производства должны быть валидированы, в том числе, эффективность каждого этапа очистки в отношении удаления и/или инактивации посторонних агентов и примесей, источником которых могут быть клетки хозяина (вирусы и вирусные частицы, белки), штамм-продуцент (ДНК), а также в отношении удаления примесей, связанных с процессом производства, например, гетерологичных белков (компоненты питательных сред, иммуносорбенты для афинной хроматографии).

Набор методов исследования белка в процессе разработки препарата и методов испытаний очищенного белка, биологической фармацевтической субстанции или конечного балка биологической фармацевтической субстанции, а также готового препарата, должен быть определен и обоснован индивидуально для каждого препарата.

Оценка экспрессирующей конструкции показывает, что в клетку хозяина введена последовательность, соответствующая требуемому белку, и что она сохраняется в клеточной культуре без изменений до конца продуктивного периода.

Схема получения экспрессирующей конструкции и ее характеристика должны быть документально подтверждены и включают следующее:

- характеристику клетки-хозяина, включая источник клеток, фенотип, генотип и среду для культивирования;
- источник и характеристику гена, кодирующего целевой белок;
- происхождение составных частей экспрессирующей конструкции, информацию о входящих в её состав генах, схему её сборки, структуру полного экспрессионного вектора.

- анализ нуклеотидных последовательностей клонированного гена и фланкирующих регуляторных областей экспрессионного вектора; идентификацию всех экспрессируемых последовательностей.

Схема получения штамма-продуцента и его характеристики должны быть документально подтверждены и включают следующее:

- методы введения вектора в клетку хозяина, отбор и клонирование трансформированных клеток;
- способы индуцирования экспрессии гена и ее контроля в процессе производства;
- методы, используемые для подтверждения включения вектора в клетку хозяина, например, с использованием различных рестриктаз, метода иммуноблоттинга (саузерн-блот), анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК;
- последовательность ДНК в клонированном гене подтверждают на стадии штамма-продуцента, ГБК и РБК;
- копийность, состояние и стабильность вектора в клетке-хозяине.

Стабильность генетических и фенотипических характеристик штамма-продуцента должна быть показана на материале, полученном до и после количества удвоений или количества пассажей клеток, ожидаемых при полномасштабном производстве. Данные должны включать сведения о проценте клеток, удерживающих экспрессирующую конструкцию, копийность гена, уровень экспрессии белка, характеристику рекомбинантного белка установленными методами и/или нуклеотидную последовательность гена (при использовании любого метода должен быть указан предел обнаружения отклонений от установленных параметров).

ПРОИЗВОДСТВО

Система банков клеток. Для получения рекомбинантного белка должна использоваться система банков клеток, которая обычно включает

Главный банк клеток (ГБК) и Рабочий банк клеток (РБК). Банки клеток должны быть охарактеризованы в соответствии с ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства ИЛП» с учетом требований к характеристике экспрессирующей конструкции.

ГБК является производным от отобранного клеточного клона, содержащего экспрессирующую конструкцию. РБК используют для производства каждой серии готового продукта. Образцы рабочего банка клеток необходимо хранить, как минимум, до истечения срока годности последней выпущенной партии препарата.

Хранение контейнеров с клетками в обоих банках клеток осуществляют в одинаковых условиях. Контейнеры с клетками используются только один раз, повторное замораживание клеточного материала не допускается.

Аналогичная система банков должна быть предусмотрена для клеток хозяина. Рекомендуется также создание банка экспрессионного вектора.

Сведения о банках клеток должны быть документированы и включать следующую информацию:

- назначение;
- история создания клеточной линии и получения банков клеток, включая методы и реагенты, использованные в процессе культивирования;
- условия их хранения и стабильность, включая среду для криоконсервирования;
- указание значимых фенотипических и генетических маркеров;
- способ введения вектора в клетку хозяина;
- способы индукции и контроля уровня экспрессии;
- отсутствие в банке онкогенных и посторонних агентов: вирусов, бактерий (в том числе, микоплазм), грибов;
- отсутствие у клеточных линий онкогенности, если не обосновано иное в фармакопейной статье или нормативной документации;
- характеристика экспрессирующей конструкции.

В характеристике экспрессирующей конструкции указывают:

- физическую (рестрикционную) карту экспрессирующей конструкции (вектора);
- число копий гена, наличие вставок или делеций, число мест интеграции методом картирования с помощью рестрикционных эндонуклеаз или других подходящих методик;
- процент клеток, удерживающих экспрессирующую конструкцию;
- нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок.

С учетом предела обнаружения используемого метода последовательность нуклеиновой кислоты должна быть идентична последовательности, установленной для экспрессирующей конструкции, и соответствовать планируемой аминокислотной последовательности белка. Нуклеотидная последовательность гена должна быть подтверждена не только на стадии посевного материала, но и на конечной стадии роста клеточной популяции (при использовании для ферментации в производстве новой серии РБК и ГБК). При отсутствии возможности такого анализа (например, при непрерывном культивировании клеточных линий с мультикопийным геном) следует использовать анализ матричной РНК (мРНК) или анализ общей клеточной ДНК методом саузерн-блота. Подтверждением нуклеотидной последовательности экспрессирующей конструкции может быть уровень экспрессии и характеристика очищенного белка. При выявлении каких-либо различий между запланированным и полученным вариантами нуклеотидных последовательностей, необходимо их чёткое обозначение, обоснование допустимости различий и представление данных о том, что они являются устойчивыми и способными к постоянной экспрессии целевого белка;

В нормативной документации должны быть указаны методы контроля соответствующих показателей.

Если создается только РБК, исследования должны проводиться для каждого нового РБК.

Происхождение, описание, методы и результаты испытаний, хранение,

использование клеток ГБК и РБК, а также их стабильность в течение времени должны документироваться в полном объеме.

Культивирование и сбор продукта

Культивирование клеток и сбор продукта может быть выполнен одним из следующих способов.

Производство с однократным сбором продукта. Клетки культивируются до определенного числа пассажей или уровня удвоения популяции клеток, которое устанавливается на основе данных по изучению стабильности клеточной линии и которое нельзя превышать в процессе производства. Продукт собирается одновременно.

Производство с многократным сбором продукта (непрерывное культивирование). Клетки культивируются непрерывно в течение определенного периода, установленного на основе данных по стабильности системы и постоянства качества продукта до и выше установленного предела возраста клеток *in vitro*. В течение всего периода культивирования клеток необходим мониторинг системы. Требуемая частота и тип мониторинга зависят от природы системы экспрессии и продолжительности непрерывного культивирования. Необходим сбор данных о молекулярной целостности экспрессируемого гена и о значимых фенотипических и генотипических маркерах штамма-продуцента.

Каждый сбор проверяется на содержание белка, полученного методами рекомбинантной ДНК; микробиологическую чистоту; наличие эндотоксинов и микоплазмы. Рутинный контроль на посторонние вирусы выполняется на определенном этапе в зависимости от производственной схемы и природы используемых материалов.

Критерии приемлемости сбора определяются установленной процедурой мониторинга.

Очистка продукта

Сборы могут быть объединены перед началом процедуры очистки.

Процедуры удаления и/или инактивации инфекционных агентов и

удаления примесей, связанных с продуктом или процессом производства, должны быть валидированы и обеспечивать постоянство качества и биологической активности продукта. Процесс очистки продукта должен также включать стадии, позволяющие удалять и/или инактивировать оболочечные и безоболочечные вирусы.

Если в процессе производства предусматривается хранение очищенного белка или других промежуточных продуктов, должны быть указаны сроки хранения каждого промежуточного продукта, подтвержденные данными о стабильности продукта в течение указанного времени.

При валидации производственного процесса следует документировать:

- удаление или снижение содержания и инактивацию посторонних агентов, например, вирусов;
- удаление или снижение содержания ДНК штамма-продуцента и белков клетки хозяина до установленных пределов в конечном продукте;
- удаление гетерологичных белков и веществ, используемых при очистке (например, белков питательной среды, белков, использовавшихся в носителях для аффинной хроматографии, реагентов для центрифугирования в градиенте плотности и других способов очистки, и т.п.);
- содержание основного компонента и родственных соединений;
- стабильность полупродуктов на промежуточных стадиях производства в случае необходимости их хранения;
- качество партий очищенного белка, серий биологической фармацевтической субстанции (или конечного балка биологической фармацевтической субстанции для хранения, если препарат производится в непрерывном производственном цикле), серий препарата.

Качество должно контролироваться в соответствии с установленными требованиями на этапах производства или спецификациями. Требования к показателям чистоты устанавливаются для конкретного препарата и должны

обеспечивать его безопасность и эффективность. Рекомендуемое содержание мономера (основного компонента) – не менее 92,5 %, мономера вместе с димером – не менее 95 %.

Очищенный белок

Очищенный белок является промежуточным продуктом технологического процесса и может быть не предназначен для хранения. Формирование партии очищенного белка должно быть установлено и документировано производителем.

Показатели качества очищенного белка устанавливают на основе результатов исследований характеристики белка, т.е. показателей, установленных на этапе разработки препарата и максимально полно характеризующих физико-химические, иммунохимические и биологические свойства белка, полученного с помощью методов рекомбинантной ДНК, до добавления стабилизаторов и вспомогательных веществ.

Для характеристики белка следует использовать широкий набор аналитических методов, основанных на оценке различных химических и физических свойств белковой молекулы (например, размер, заряд, изоэлектрическая точка, аминокислотная последовательность, гидрофобность). В ходе испытаний необходимо оценить первичную структуру белка и его конформацию, т.е. структуры белка более высокого порядка (вторичная, третичная, четвертичная). Должны быть идентифицированы и соответствующим образом охарактеризованы посттрансляционные модификации белка, например, гликозилированные формы, родственные соединения, а также посторонние примеси. Особое внимание следует уделить структурам или углеводородным остаткам, не обнаруживаемым у природного белка, наличие которых может привести к нежелательным побочным эффектам. Должна быть охарактеризована биологическая активность белка, количественным выражением которой является специфическая активность. Для оценки активности предпочтительно использование биологического метода, который

характеризует биологическую активность белка при клиническом применении. При необходимости следует охарактеризовать иммунохимические свойства. Все используемые методы должны быть обоснованы. Характеристика белка, полученная данными методами, формирует требования к стандартному образцу, необходимому для оценки подлинности и чистоты белка.

Очищенный белок должен оцениваться на подлинность, чистоту, специфическую активность, удельную активность (активность на единицу массы белка), микробиологическую чистоту, бактериальные эндотоксины с использованием соответствующих методов и стандартных образцов (СО). При оценке подлинности необходимо подтверждение первичной структуры белка. При оценке чистоты необходимо определение родственных соединений и посторонних примесей. К родственным соединениям относятся димеры, полимеры, агрегаты, модифицированные формы (окисленные, деамидированные, укороченные формы белка, продукты деградации белка), формы белка с нетипичным формированием дисульфидных связей, наличием N- и O-гликозидных модификаций. К посторонним примесям относятся субстраты, появление которых связано с технологическим процессом (например, компоненты питательных сред, белок и ДНК клеток хозяина и штамма-продуцента, иммуносорбенты для аффинной хроматографии и другие вещества, использовавшиеся в процессе производства).

При необходимости в очищенном белке оценивают степень и профиль гликозилирования, содержание углеводов и липидов.

Требования к очищенному белку указывают во внутренней спецификации.

Для подтверждения подлинности получаемого белка возможно использование комплекса различных методов:

- секвенирование N-концевой последовательности и определение C-концевой аминокислоты;
- пептидное картирование, с применением химического или

ферментативного расщепления белка. Последующий анализ полученных пептидных фрагментов с помощью жидкостной хроматографии, в том числе с масс-спектрометрическим детектором, капиллярного электрофореза или двумерного гель-электрофореза, должен показать отсутствие существенных различий между испытуемым образцом и образцом сравнения (международные стандартные образцы, стандартные образцы отечественной или зарубежных Фармакопей, стандартные образцы производителя); полученные результаты должны быть сравнены с теоретически возможными результатами;

– круговой дихроизм, ИК спектроскопия с преобразованием Фурье, рентгеноструктурный анализ, дифференциальная сканирующая калориметрия, протонный ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена могут быть использованы для исследования вторичной, третичной и четвертичной структур белка;

– углеводное картирование, аминокислотный анализ, электрофоретические и другие обоснованные методы также могут быть использованы для подтверждения подлинности получаемого белка.

Для оценки чистоты белка могут использоваться различные методы: химические (определение белка, углеводов, липидов и др.); физико-химические (углеводное картирование, электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография (эксклюзионная, обращенно-фазная, ионообменная)); иммунохимические методы – иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, а также другие обоснованные методы.

Требования к показателям и набор соответствующих методов контроля очищенного белка, которые используются в процессе производства, зависят от результатов валидации технологического процесса, постоянства качества и количества примесей, появление которых связано с продуктом или процессом очистки, и может включать не все методы, используемые для

характеристики белка при разработке препарата. Требования к показателям и набор методов контроля должен быть обоснован и включать контроль показателей, которые не могут быть оценены в фармацевтической субстанции/конечном балке, но являются значимыми для обеспечения безопасности и эффективности готового препарата.

ИСПЫТАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Биологическую фармацевтическую субстанцию или, если препарат производится в непрерывном цикле, конечный балк биологической фармацевтической субстанции для хранения (далее – субстанция или конечный балк) готовят из одной или нескольких партий очищенных белков. В процессе приготовления субстанции или конечного балка могут быть внесены стабилизирующие агенты и другие вспомогательные вещества.

Для производства серии готового препарата могут быть использованы субстанция или конечный балк, удовлетворяющие требованиям спецификации на субстанцию или установленные для конечного балка (внутренняя спецификация). Если после добавления стабилизирующих агентов и вспомогательных веществ какой-либо из показателей не может быть определен, его контроль должен проводиться на очищенном белке.

Подлинность. Подлинность может быть определена с помощью комплекса методов, включающих определение специфической активности и пептидное картирование, а также такие методы, как электрофорез в полиакриламидном геле (в том числе, с последующим иммуноблоттингом), капиллярный электрофорез и изoeлектрическое фокусирование, ионообменную или обращено-фазную высокоэффективную хроматографию с использованием стандартных образцов. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован и указан в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или при установлении требований к конечному балку во внутренней спецификации.

Микробиологическая чистота. Должны быть предусмотрены

требования и испытания микробиологической чистоты субстанции (или конечного балка) до стерилизующей фильтрации.

Стерильность. Субстанция (или конечный балк) должны быть стерильными, если хранятся после стерилизующей фильтрации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию, или требованиям, установленным на конкретный препарат. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Выбор комплекса методов для контроля чистоты должен быть обоснован. Требования к показателям должны обеспечивать безопасность и эффективность препарата.

Родственные соединения (связанные с продуктом) и посторонние примеси (связанные с процессом производства) оценивают на стадии получения очищенного белка, если анализ не может быть выполнен на субстанции (или конечном балке). Должно быть охарактеризовано содержание основного компонента и родственных соединений – димеров, агрегатов, модифицированных форм белка (окисленных, деамидированных, укороченных).

Для определения чистоты используют комплекс методов: электрофорез в полиакриламидном геле (так называемый, SDS-PAGE электрофорез) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; капиллярный электрофорез; изоэлектрофокусирование; высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и другие обоснованные и валидированные производителем методы, при проведении которых должно быть предусмотрено использование стандартных образцов (СО). Методы испытаний указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тесты для определения содержания белков клеток-хозяина, ДНК штамма-продуцента, а также иных посторонних примесей, связанных с процессом производства (бычий сывороточный альбумин, трансферрин, инсулин, белок А, моноклональные антитела и другие белковые и небелковые примеси) проводятся на достаточном количестве партий (не менее 5) очищенного белка или серий субстанции (конечного балка). Содержание остаточной ДНК штамма-продуцента белков клеток-хозяина и других примесей, не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации, и не превышать показателей, определенных международными требованиями. Методы оценки примесей и способ расчета данных примесей в лекарственном препарате должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или при указании требований к конечному балку.

Остаточные белки клетки-хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или ИФА). Для получения антигена, используемого как для последующей выработки поликлональных антител к белкам клетки-хозяина, так и для построения калибровочного графика, следует использовать следующую процедуру (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). Клетки хозяина культивируются и подвергаются процедуре выделения и очистки. Количество стадий очистки определяется производителем. Из очищенных клеток получают антиген, который представляет собой смесь белков. Следует провести количественное определение белка в составе полученного антигена подходящим методом и хранить в условиях, обеспечивающих его стабильность в течение продолжительного времени. Иммунохимические методы для определения остаточных белков штамма-продуцента должны отвечать следующим требованиям:

- антиген должен представлять максимально возможное количество белков-антигенов;
- поликлональные антитела, вырабатываемые на полученный таким образом антиген, должны связывать максимально возможное количество белков-антигенов и не давать перекрестного связывания с целевым белком;
- оценку результатов проводят, сравнивая данные тестирования испытуемого образца с калибровочным графиком, полученным при тестировании антигена;
- для определения остаточных белков клеток хозяина возможно использование готовых наборов реагентов, использование которых должно быть подтверждено материалами валидации методики.

Остаточная ДНК штамма-продуцента может быть определена методом гибридизации с зондами, мечеными биотином, дигоксигенином или другой меткой.

Для получения стандартной пробы проводят выделение ДНК клеток продуцента. Количественное определение содержания ДНК в стандартных пробах проводят спектрофотометрически. При проведении анализа следует убедиться, что белок, полученный в результате производственного процесса, не влияет на определение ДНК.

Оценку результатов проводят, сравнивая данные тестирования испытуемого образца с данными, полученными при тестировании стандартных проб ДНК штамма-продуцента.

Допускается определение остаточной ДНК штамма-продуцента методом ПЦР в реальном времени, а также методами, не связанными со специфической нуклеотидной последовательностью. К ним относятся:

- связывание ДНК с мечеными антителами к ДНК и последующая реакция полученного комплекса с антителом к этому белку (Threshold);
- непосредственное связывание ДНК с флуоресцентным

красителем.

Для оценки посторонних примесей могут использоваться наборы реагентов после валидации методики. Данные тесты могут проводиться не для каждой партии очищенного белка или серии субстанции (или конечного балка), если имеется документально подтвержденное постоянство и эффективность процедуры очистки, в том числе по результатам валидации процесса очистки.

Транспортирование и хранение. Контролируемые условия, обоснованные исследованиями по стабильности субстанции (или конечного балка), а также стабильности приготовленного из них лекарственного средства, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или при указании требований к конечному балку.

ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Требования и методы испытаний по всем показателям качества указывают в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное средство. Выбор комплекса методов должен быть обоснован.

Описание. Лекарственные препараты в жидкой или восстановленной лиофилизированной лекарственной форме – прозрачные или слегка опалесцирующие бесцветные, с желтоватым или другим оттенком растворы без видимых частиц, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. В зависимости от природы белка, подлинность может быть определена с помощью различных методов, включая электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, ионообменную или обращено-фазную хроматографию, иммуноблоттинг, пептидное картирование с использованием стандартных образцов, которые должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Для оценки подлинности используется также метод определения специфической активности.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветный или с желтоватым оттенком раствор (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Время растворения (для лиофилизированных лекарственных средств). Не более 5 мин (если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других предписаний), с указанием состава и объема восстанавливающей жидкости, а также условий растворения.

pH. Значения и допустимые пределы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных лекарственных средств). Не более 3,0 %, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Вода (для лиофилизированных лекарственных средств). Предельно допустимое содержание воды и навеску препарата, в которой проводят определение, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды».

Извлекаемый объем. Должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации, и быть не менее номинального. Определение проводят по ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Допустимые пределы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение

видимых частиц проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Определение невидимых частиц проводят в соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Общий белок. Допустимые пределы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Общее содержание белка определяют по ОФС «Определение белка» с указанием метода определения или другой валидированной методикой, приведенной в нормативной документации

Распределение по молекулярной массе. Распределение по молекулярной массе определяют методом эксклюзионной хроматографии (гельфилтрации) или другими валидированными методами. Значение и допустимые пределы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Чистота. Требования к содержанию примесей должны обеспечивать безопасность и эффективность препарата. Выбор комплекса методов для контроля чистоты должен быть обоснован. Определение проводят различными методами с использованием стандартных образцов: методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (в том числе, в сочетании с иммуноблоттингом); методом капиллярного электрофореза; методом обращено-фазной или ионообменной хроматографии, а также с помощью других обоснованных и валидированных производителем методов.

Препараты должны испытываться на содержание димеров, агрегатов, модифицированных форм белка (окисленных, деамидированных, укороченных) по методикам, приведенным в фармакопейной статье или нормативной документации. Если анализ не может быть проведен в готовой продукции, родственные соединения оценивают на стадии получения очищенного белка или фармацевтической субстанции/конечного балка.

Посторонние примеси оценивают на стадии получения очищенного

белка или субстанции/конечного балка. Содержание примесей должно быть регламентировано, обеспечивать безопасность препарата и не превышать требований указанных в фармакопейной статье. В фармакопейной статье или нормативной документации должен быть указан способ расчета данных примесей в лекарственном препарате.

Специфическая активность. Специфическую активность оценивают соответствующими методиками, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации, с использованием стандартных и контрольных образцов.

Стерильность. Лекарственный препарат Должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Лекарственный препарат должен быть апиrogenным или (в зависимости от природы лекарственного средства) должна быть установлена минимальная пирогенная доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вспомогательные вещества. При наличии в составе препарата вспомогательных веществ (стабилизаторы, консерванты и др.) методики их определения и допустимые пределы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, не допускается замораживания (если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний). Контролируемые условия, обоснованные исследованиями по стабильности препарата, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики.

Пробиотики – иммунобиологические лекарственные препараты, которые содержат живые или инактивированные апатогенные микроорганизмы (эубиотики), обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, а также продукты их жизнедеятельности или факторы роста для микробов нормофлоры (пребиотики) и их рациональные комбинации друг с другом (синбиотики). Эта группа препаратов оказывает положительные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма человека благодаря стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры.

Эубиотики следует рассматривать как частную разновидность пробиотиков; наиболее часто данное определение распространяется на пробиотики, полученные из одного (или нескольких) штаммов живых бактерий, являющихся облигатными симбионтами организма человека (согласно современной терминологии термин «эубиотики» считается устаревшим). В дальнейшем в данной статье будет использоваться термин «пробиотики» для описания ИЛП на основе живых микроорганизмов и веществ микробного происхождения.

Пробиотики для медицинского применения предназначены для лечения

и профилактики острых и хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, полости рта, урогенитального тракта и др. органов инфекционной и неинфекционной природы (особенно при одновременном применении антибиотиков), сопровождающихся нарушениями нормальной микрофлоры у детей и взрослых, и для коррекции дисбиозов различной этиологии.

Пробиотики для медицинского применения по составу подразделяются на:

- *монокомпонентные* – пробиотики, полученные на основе одного штамма живых микроорганизмов;
- *поликомпонентные* – пробиотики, в состав которых входят несколько штаммов микроорганизмов, принадлежащих к одному или нескольким видам или родам, дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам;
- *сорбированные* – пробиотики, полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного и других сорбентах;
- *комбинированные* – пробиотики, в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, действующие вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека.

Пробиотики по таксономическим группам микроорганизмов, входящих в их состав, подразделяются на:

- *бифидосодержащие пробиотики* – содержат один или несколько видов живых бактерий рода *Bifidobacterium*;
- *лактосодержащие пробиотики* – содержат живые бактерии рода *Lactobacillus*, одного или нескольких видов;
- *колисодержащие пробиотики* – получены на основе одного или нескольких штаммов живых бактерий *Escherichia coli*;

- *споровые пробиотики* – получены на основе одного или нескольких видов живых непатогенных представителей рода *Bacillus*;
- *пробиотики других таксономических групп* – содержат живые апатогенные бактерии, принадлежащие к родам *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, и дрожжевые грибы – *Saccharomyces cerevisiae* и *S.boulardii*.

Характеристика исходных компонентов и промежуточных продуктов, получаемых на разных этапах производства

Производственные штаммы

При производстве пробиотиков для медицинского применения используются производственные штаммы с подтвержденным клиническим эффектом, депонированные в национальной или международной коллекции, которые идентифицированы до вида (штамма) по фенотипическим и генотипическим признакам: по физиолого-биохимическим свойствам; спектру антагонистической активности к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; по профилю внехромосомной ДНК (по содержанию или отсутствию) внехромосомных факторов наследственности – R-плазмид, транспозонов, бактериофагов; природе резистентности к антибиотикам (если данный признак имеет место). Пробиотические штаммы микроорганизмов должны быть апатогенны и безопасны, не продуцировать ферменты патогенности (каталазу, гиалуронидазу, фибринолизин, плазмокоагулазу, гемолизин, летициназу С, нейраминидазу и др.); в их геноме должны отсутствовать «островки патогенности». Кроме того, эти штаммы не должны быть чувствительными к воздействию желудочного сока, желчи и щелочей.

Для генетически модифицированных штаммов должно быть установлено отсутствие неконтролируемого переноса клонируемой ДНК, широкого распространения гибридной векторной плазмиды и вероятного нарушения микробной экосистемы, т.е. их биобезопасность. Молекулы ДНК,

используемые в качестве вектора, должны стабильно реплицироваться в клетке-реципиенте и не иметь маркеров антибиотикорезистентности. Рекомбинантные штаммы при многократном культивировании и длительном пассировании на лабораторных животных должны сохранять все первоначальные биологические свойства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство пробиотиков должно осуществляться в отдельных помещениях, где не проводят работы с патогенными микроорганизмами и антибиотиками и соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Не допускается производство пробиотиков на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков. Обязательным условием технологического процесса производства пробиотиков является соблюдение принципа поточности, исключающего возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними агентами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

При производстве пробиотиков проводят валидацию технологического процесса, технологического оборудования, сырья и методов контроля. Соответствие всех реагентов, материалов и сырья, используемых при производстве, нормативным требованиям должно быть подтверждено в установленном порядке; все материалы должны быть разрешены для использования при производстве ИЛП. Вспомогательные вещества, входящие в состав пробиотиков, должны использоваться в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Антибиотики не должны использоваться ни на одной из стадий получения лекарственного средства.

При производстве пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа

основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, анализа качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Требования к производству пробиотиков для медицинского применения

А. Получение производственного штамма

Производственные питательные среды не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Соответствие всех реактивов, реагентов и сырья, используемых при производстве питательных сред, нормативным требованиям должно быть подтверждено в установленном порядке, все материалы должны иметь сертификаты соответствия. Питательные среды должны обладать высокими ростовыми свойствами и быть стерильными.

Штаммы, используемые при производстве пробиотиков, должны ежегодно проверяться по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями, описанными ниже.

Подлинность. Штамм должен быть идентифицирован до вида с помощью микробиологических методов (например, микроскопического, бактериологического и др.), которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии (например, амплификация нуклеиновых кислот или секвенирование). Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, биохимическими и культуральными свойствами. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Безопасность. Безопасность штамма определяется биологическими методами *in vivo* (например, исследованием безвредности, токсичности, токсигенности, вирулентности и т.п.) в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием набора селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех вероятных контаминантов.

Штамм не должен содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность штамма в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют бактериологически, например, методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов или методом совместного культивирования (определение проводят в соответствии с ОФС «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения»). Штамм должен проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не должен угнетать рост представителей нормофлоры. Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, и характеристики их биологических свойств.

Кислотообразующая активность. Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом в соответствии с ОФС «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения». Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Хранение, упаковка. Производственный штамм хранят при температуре и прочих условиях, обеспечивающих его стабильность. Производственный штамм, расфасованный в первичную упаковку (ампулы, флаконы), в лиофилизированном виде хранят при температуре, обеспечивающей его стабильность.

Б. Получение посевного материала

Главный посевной материал микроорганизмов получают из производственного штамма, выращенного на адекватной среде в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с последующей лиофилизацией.

Главный посевной материал должен соответствовать описанным ниже требованиям.

Подлинность. Подлинность посевного материала определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Подлинность», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех потенциальных контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение, упаковка. Маточную культуру расфасовывают в первичную упаковку и хранят в условиях, установленных для хранения производственного штамма.

В. Получение производственной биомассы

Производственную биомассу получают путем культивирования посевного материала двумя способами: стационарным (в бутылках) или глубинным (в реакторах) с последующим добавлением стабилизатора – среды высушивания.

Производственная биомасса должна соответствовать нижеперечисленным требованиям.

Подлинность. Подлинность посевного материала определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

рН. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Г. Этап розлива, лиофилизации и укупорки

Производственную биомассу разливают в первичную упаковку или поддоны и лиофилизируют при соответствующих условиях. Первичную упаковку (ампулы, флаконы) укупоривают в атмосфере инертного газа и проверяют на герметичность и потерю в массе при высушивании в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Д. Этап получения лекарственного препарата в различных лекарственных формах

Пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории. Показатели качества лекарственного средства оценивают по соответствующей лекарственной форме (лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории).

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственной формы таблетки, суппозитории и порошки оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки», «Суппозитории», «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Подлинность подтверждают микробиологическими методами (микроскопическим и/или бактериологическим). Испытание

проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов, порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата. Указывают применяемый растворитель (среда восстановления), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, режим перемешивания и пр.).

Время восстановления раствора (суспензии) для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний.

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Время распадаемости указывают в нормативной документации. Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, режим перемешивания и пр.).

При проведении теста «Распадаемость» следует учитывать, что время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Температура и время плавления или время полной деформации (для суппозиториев). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют температуру плавления по методу 2 (ОФС «Температура плавления»), которая не должна превышать 37⁰С, если нет иных указаний в нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе». Время полной деформации не должно превышать 20

мин, если нет других указаний в нормативной документации.

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывается допустимый интервал значений pH (в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель и его объем).

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом. Требования к величине потери в массе при высушивании указывают в нормативной документации.

Если нет других указаний в нормативной документации, показатель потери в массе при высушивании должен составлять для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, суппозиторий, содержимого капсул и пакетов). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Извлекаемый объем (для суспензий). Извлекаемый объем должен соответствовать требованиям, указанным в нормативной документации, и должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля, и их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность

наблюдения, учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Пробиотики должны соответствовать следующим требованиям:

- категории 5.3.А (для лекарственной формы лиофилизаты, суспензии, порошки);
- категории 5.3.Б (для лекарственной формы таблетки, капсулы, суппозитории, мази).

В нормативных документах на пробиотики для детей введены более строгие нормы, а именно:

- для детей (от 3 месяцев до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 10 аэробных бактерий в 1 единице препарата/в г; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и дрожжевых и плесневых грибов;

- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 50 аэробных бактерий в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата: энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в одной дозе лекарственного средства, активностью кислотообразования или антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Описание метода может включать использование стандартных образцов, тест-штаммов, учитываемые показатели, методы расчета результатов и при необходимости их статистическую обработку.

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе препарата пробиотиков проводят методом серийных разведений с последующим высевом (при необходимости) на агаризованные питательные среды. При проведении контроля поликомпонентных или комбинированных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат.

Определение специфической активности пробиотиков дополнительно включает определение активности кислотообразования или антагонистической активности.

Антагонистическую активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов.

Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом. Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).
2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим, в том числе, биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и Маркировка. Раздел оформляется в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и Хранение. Пробиотики для медицинского применения транспортируются и хранятся при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие апатогенные спорообразующие бактерии (далее по тексту – «споровые пробиотики»).

Споровые пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий рода *Bacillus*, лиофильно высушенную в защитной среде, либо их суспензию в 7 % растворе натрия хлорида.

Споровые пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, полученные на основе одного производственного штамма бактерий рода *Bacillus* (например, *B.subtilis* 534 или *B.subtilis* 3Н);
- *Поликомпонентные*, полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий рода *Bacillus*, принадлежащих к разным видам (например, *B.subtilis* 3 и *B.licheniformis* 31), дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus*

Штаммы бактерий рода *Bacillus*, используемые для производства споровых пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Таблица 1 – Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus*, используемые в производстве споровых пробиотиков в РФ

Название производственного штамма бактерий рода <i>Bacillus</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>B. subtilis</i> 3	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2335
<i>B. licheniformis</i> 31	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2336
<i>B. subtilis</i> 534	Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина РАН; ВКМ № 1666 Д
<i>B. subtilis</i> 3 Н	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 248

Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий рода *Bacillus*

Название штамма	Описание морфологических и культуральных свойств
<i>B. subtilis</i> 3	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки размером 2,7×0,8 мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются. Аэроб; не растет в анаэробных условиях. На питательной среде в мясопептонном агаре (МПА) или среде Гаузе № 2 после инкубации при температуре (37±1) °С в течение 24 ч образует матовые складчатые колонии телесного цвета с изрезанными краями, легко снимающиеся петлей с агаризованной среды. На мясопептонном бульоне (МПБ) или бульоне Хоттингера образует беловатую пленку, вызывая незначительное помутнение среды
<i>B. licheniformis</i> 31	Грамположительные спорообразующие палочки размером 2,5×0,6

	мкм располагаются в основном в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, расположенные в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются. Может расти в анаэробных условиях. На питательной среде МПА или Гаузе № 2 после инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч образует гладкие круглые коричневатые колонии, плохо снимающиеся петлей с агаризованной среды. В МПБ дает придонный рост с помутнением среды
<i>B. subtilis</i> 534	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером $2,8\times 0,7$ мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются. Не растет в анаэробных условиях. На питательной среде МПА после инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч образует белые шероховатые и гладкие колонии (допустимо наличие до 50 % гладких белых колоний), легко снимающиеся петлей с агаризованной среды. На МПБ или бульоне Хоттингера растет в виде беловатой пленки и слабого придонного осадка, вызывая незначительное помутнение среды
<i>B. subtilis</i> 3 Н	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером $(1,5-4,0)\times(0,4-0,6)$ мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются. Не растет в анаэробных условиях. На питательной среде Гаузе № 2 или полусинтетической среде с дрожжевым диализатом после инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч образует шероховатые розовато-бежевые или коричневые колонии с фестончатыми краями, легко снимающиеся петлей с агаризованной среды (допустимо наличие до 20 % гладких белых или прозрачных колоний). На МПБ образует беловатую пленку и слабый придонный осадок, вызывая незначительное помутнение среды

Таблица 3—Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Bacillus*

Свойства	Штаммы бактерий рода <i>Bacillus</i>			
	<i>B. subtilis</i> 3	<i>B. licheniformis</i> 31	<i>B. subtilis</i> 3 Н	<i>B. subtilis</i> 534
Ферментация				
- глюкозы	+	+	+	+
- арабинозы	+	-	+	+
- ксилозы	+	+	+	+
- маннита	+	+	+	+
Образование кислоты и газа из глюкозы	-	-	-	-
Образование кислоты из глюкозы	+	+	+	+
Утилизация				
- цитрата	+	+	+	+
- пропионата	-	+	-	-
Гидролиз				
- крахмала	+	+	+	+
- мочевины	-	-	-	-
- казеина	+	+	+	+
- тирозина	-	-	-	-
Редукция нитратов	+	+	+	+
Образование газа из NO ₃ ⁻ в анаэробных условиях	-	+	-	-
Обесцвечивание метиленового синего	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+	+
Аргининдегидролаза	-	+	+	-
Лецитиназа	-	-	-	-
Гиалуронидаза	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-
Образование глобул поли-β-ксимасляной кислоты на глюкозном агаре	-	-	-	-
Лизоцимная активность	+	+	-	+
Рост при 50 °С	+	+	+	+
Рост при 65 °С	-	-	-	-
Рост в 7 % NaCl	+	+	+	+
Устойчивость к воздействию желудочного сока	+	+	+	+
Устойчивость к воздействию желчи	+	+	+	+
Адгезивная активность	-	-	-	-
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов в мм на агаризованной среде Гаузе 2)	не менее 10–15	не менее 10–15	не менее 10–15	не менее 10–15

Примечание: «+» положительный тест, «-» отрицательный тест

Таблица 4– Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Bacillus*

№ штамма	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводи- мая доза, $\times 10^{10}$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, $\times 10^9$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи- мая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
<i>B. subtilis</i> 3	0,1	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0	1,0	10/0
	1	10/0	1	10/0	1,0	10/0		10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		10/0
<i>B. licheniformis</i> 31	0,1	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0
	1	10/0	1	10/0	1,0	10/0		10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		10/0
<i>B. subtilis</i> 534	0,1	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0
	1	10/0	1	10/0	1,0	10/0		10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		10/0
<i>B. subtilis</i> 3H	0,1	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0
	1	10/0	1	10/0	1,0	10/0		10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		10/0

ПРОИЗВОДСТВО

Производство споровых пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма (или штаммов) бактерий рода *Bacillus* на оптимальной питательной среде в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с возможной последующей лиофилизацией полученной биомассы в защитной среде.

При производстве споровых пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества лекарственных средств доказывают, что конкретная методика, процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность персонала или система действительно приводят к ожидаемым результатам, и гарантируют, что лекарственный препарат получен в соответствии со своим составом, не

содержит контаминантов, маркирован надлежащим образом, упакован и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

При производстве споровых пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, анализа качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Споровые пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), суспензии, таблетки и капсулы.

Показатели качества лекарственного препарата оценивают по соответствующей лекарственной форме (лиофилизата во флаконе, суспензии, таблеток и капсул).

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного препарата в лекарственной форме лиофилизаты, суспензии, таблетки и капсулы оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Суспензии», «Таблетки» и «Капсулы».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата.

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму или по Циллю-Нильсену), бактериологическим (описание вида колоний, выросших на адекватных питательных средах, и подтверждается специфической активностью). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата (для

лиофилизатов – не более 5 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Указывают время, необходимое для растворения лекарственного препарата, применяемый растворитель (среда восстановления), его объем и при необходимости условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание).

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Указывают применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание) и время, необходимое для растворения лекарственного препарата.

pH (для лиофилизатов, суспензий, капсул, таблеток). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывают допустимый интервал значений pH; в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель (среда восстановления) и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизатов, капсул, таблеток). Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации):

- лиофилизаты – не более 3,5 %;
- капсулы – не более 3,5 %;
- таблетки – не более 4,5 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, содержимого капсул). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Извлекаемый объем (для суспензий). Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем». Извлекаемый объем должен соответствовать требованиям, указанным в нормативной документации, и должен быть не менее номинального.

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля, и их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения, учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение контаминации испытуемого препарата проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева. Споровые пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

- категория 5.3.А (лиофилизаты, суспензии, порошки);
- категория 5.3.Б (таблетки, капсулы).

Указывают используемые питательные среды, количество и объем испытуемого материала, условия инкубации и ее продолжительность, правила учета результатов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и антагонистической активностью препарата по

отношению к тест-штаммам. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

В 1 дозе препарата должно содержаться не менее 10^9 КОЕ, если в нормативной документации не указаны другие требования. Зоны задержки роста тест-штаммов условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов рода *Candida* должны быть не менее 10 мм, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе готового препарата проводят методом серийных разведений с последующим высевом на оптимальные питательные среды (на агаризованную среду Гаузе №2, полусинтетическую среду с дрожжевым диализатом или мясопептонный агар, если в нормативной документации не приведены другие среды). При проведении контроля поликомпонентных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат.

Антагонистическую активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на агаризованной среде Гаузе № 2 или полусинтетической среде с дрожжевым диализатом (если в нормативной документации не приведены другие среды) по зонам задержки роста тест-штаммов (в мм).

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться следующая информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим и биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в 3 года, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Безопасность пробиотиков
в тестах *in vivo*

ОФС.1.7.2.0001.15
Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения безопасности пробиотических производственных штаммов и пробиотиков, приготовленных на их основе, для медицинского применения.

Для определения безопасности испытуемого препарата используют биологические методы *in vivo*. Биологическими методами *in vivo* определяют следующие показатели:

1. Безвредность (раздел 1);
2. Вирулентность (раздел 2);
3. Токсичность (раздел 3);
4. Токсигенность (раздел 4).

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Требования к безопасности испытуемого препарата касаются подтверждения безвредности и отсутствия токсичности, токсигенности и вирулентности. Испытания на безопасность позволяют выявлять возможные реакции на введение лекарственного препарата, доказывающие отсутствие риска причинения вреда здоровью в результате его применения.

Контроль испытуемого препарата по показателю «Безвредность» является обязательным при отборе и хранении производственных штаммов, отработке новых технологий производства лекарственного средства, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока

годности. Целью проведения теста на безвредность является выявление негативного воздействия испытуемого препарата на организм животного, при вероятном образовании токсических примесей (например, при нарушении производственного регламента, нарушениях условий хранения и т.п.).

Показатели «Вирулентность», «Токсичность» и «Токсигенность» являются обязательными при контроле безопасности производственных штаммов бактерий вида *Escherichia coli*, родов *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *S.boulardii* и др. микроорганизмов (разделы 2, 3 и 4 настоящей ОФС). Целью проведения тестов на вирулентность, токсичность и токсигенность является выявление возможной патогенности испытуемых штаммов, превышающей установленный ранее допустимый уровень, что может контролироваться по летальности животных или развитию у них интоксикации. Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Раздел 1. Безвредность

Испытание безвредности испытуемого препарата осуществляют при пероральном введении беспородным белым мышам одной человеческой дозы испытуемого препарата¹.

Пробоподготовка

Испытуемый препарат растворяют или разводят, в случае необходимости, 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций, подогретым до температуры 37 °С (если в фармакопейной статье нет иных указаний).

1. Приготовление испытуемого производственного штамма.

Восстановление производственного штамма (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных

¹ Человеческая доза – доза испытуемого препарата, указанная на этикетке или в инструкции по его медицинскому применению (листке-вкладыше).

питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы микроорганизмов в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков»».

Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, которую инкубируют на адекватной плотной питательной среде в адекватных для данного штамма условиях. Выросшую культуру смывают с поверхности плотной питательной среды 0,9 % раствором натрия хлорида. Смыв (суспензию) собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.). Для определения концентрации микробных клеток в полученной суспензии в оптических единицах (ОЕ) используют стандартный образец мутности 10 ЕД в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Затем суспензию бактерий разводят 0,9 % раствором натрия хлорида, получая тест-дозы испытуемых микроорганизмов в концентрации 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ОЕ в объеме 0,5 мл или не более 1,0 мл (если в фармакопейной статье нет иных указания по определению тест-дозы).

Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

2. Приготовление испытуемого препарата. Методом случайной выборки отбирают не менее 5 – 6 образцов каждой серии препарата (если в фармакопейной статье не даны иные указания). Затем готовят испытуемые образцы следующим образом:

- *лиофилизат во флаконе:* содержимое флакона ресуспензируют в 0,9 % растворе натрия хлорида, подогретого до температуры 37°C , из расчета 0,5 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8 – 10 раз;
- *порошки:* содержимое 2 пакетов разводят в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, подогревают до температуры $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и перемешивают пипеткой 8 – 10 раз;
- *таблетки:* 6 таблеток растирают в стерильной фарфоровой ступке фарфоровым пестиком, дробно (из расчета 1 мл на 1 таблетку)

добавляют 6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, подогретого до температуры 37°C , и перемешивают до гомогенной суспензии; затем суспензию пипеткой переносят в стерильный флакон;

- *капсулы*: содержимое 6 капсул помещают во флакон с 6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (из расчета 1 мл на 1 капсулу), флаконы помещают на водяную баню при температуре $(38 \pm 1)^{\circ}\text{C}$; через 20 – 30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния;

- *суппозитории*: 6 суппозиторий заливают 3 мл (из расчета 0,5 мл на 1 суппозиторий) 0,9% раствора натрия хлорида, предварительно нагретого до температуры $(39 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, выдерживают на водяной бане при той же температуре в течение 20 – 30 мин и перемешивают пипеткой до гомогенного состояния.

Методика испытания

Испытания проводят на 5 здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 14 – 16 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Животных не кормят за 3–5 ч до испытания.

Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл или не более 1,0 мл на животное. Перед каждым введением суспензию приготовленного испытуемого препарата перемешивают 6 – 8 раз. Суспензию вводят каждой мыши перорально в желудок при помощи специальной насадки на шприц (игла с незначительным изгибом и наплавленной оливой или резиновый зонд; наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного) со скоростью 0,1 мл/с.

Наблюдение за мышами осуществляют в течение 5 сут. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышей.

Учет и интерпретация результатов

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных;
- отсутствует снижение групповой массы тела животных по сравнению с исходной.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одного животного или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одно из животных не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, препарат считают выдержавшим испытание.

Раздел 2. Вирулентность

Вирулентность – биологическое свойство микроорганизмов, характеризующее степень их патогенности. Вирулентность является штаммовым признаком, который может усиливаться или ослабляться вплоть до полного исчезновения под влиянием различных факторов внешней среды. Для характеристики вирулентности пользуются количественными показателями, определяющими способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель «искусственно» зараженных ею подопытных животных.

Пробоподготовка

Проводят восстановление испытываемого производственного штамма (из лиофилизированного состояния или среды хранения) с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы микроорганизмов, в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной плотной питательной среде. Выросшую культуру с поверхности плотной питательной среды смывают стерильным

0,9 % раствором натрия хлорида. Смыв собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.).

Определяют концентрацию микробных клеток в полученной суспензии, используя стандартный образец мутности 10 ЕД в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Из полученной суспензии делают ряд десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая тест-дозы испытуемого производственного штамма 10^8 ; 10^9 ; 10^{10} ОЕ в объеме 0,5 мл (если в фармакопейной статье не даны иные указания по количеству микробных клеток в тест-дозе).

Методика испытания

Изучение вирулентности осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз испытуемого препарата.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

В опыте на 1 тест-дозу используют 10 мышей. Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Испытуемый препарат в указанном объеме вводят каждой мышѣ внутрибрюшино со скоростью 0,1 мл/с.

Наблюдение за мышами осуществляют в течение 5 – 7 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания). За животными наблюдают ежедневно, отмечая в протоколе опыта количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышѣй.

Учет и интерпретация результатов

Испытуемый штамм выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения ни в одной из групп:

- не погибает ни одно из подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации;
- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения следует сделать заключение, что при введении максимально переносимой дозы штамм не обладает вирулентностью.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одна из мышей не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытуемый штамм бактерий считают неvirulentным.

Раздел 3. Токсичность

Токсичность является важной характеристикой микроорганизмов, определяющей их способность вызывать патологические изменения в организме человека. Токсичность бактерий обусловлена наличием эндотоксинов, которые термостабильны и высвобождаются из бактериальных клеток грамотрицательных бактерий после их разрушения

Пробоподготовка

Восстановление испытуемого производственного штамма бактерий (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы бактерий, в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы

для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной плотной питательной среде. Выросшую культуру бактерий смывают с поверхности плотной питательной среды 0,9 % раствором натрия хлорида. Полученную суспензию микроорганизмов переносят в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.), затем инактивируют на водяной бане при температуре 100 °С в течение 1 ч.

После остывания определяют концентрацию микробных клеток в полученной суспензии, используя стандартный образец мутности 10 ЕД, в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Из полученной суспензии делают ряд десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая тест-дозы – $0,5 \cdot 10^9$; $1,0 \cdot 10^9$; $2,0 \cdot 10^9$ микробных клеток в объеме 0,5 мл (если в фармакопейной статье не даны иные указания).

Методика испытания

Испытание токсичности осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз испытуемого штамма бактерий.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. В опыте на одну тест-дозу используют 10 мышей. Перед испытанием определяют групповую массу всех мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-дозу вводят каждой мыши внутрибрюшинно со скоростью 0,1 мл/с.

Осуществляют ежедневное наблюдение за животными в течение 5 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания), отмечая в протоколе опыта количество живых и павших мышей. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу животных.

Учет и интерпретация результатов

Испытуемый штамм бактерий выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения ни в одной из групп:

- не погибает ни одно из подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации;
- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

При отсутствии погибших животных, признаков нарушения их здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения следует сделать заключение, что при введении максимально переносимой дозы штамм не обладает токсичностью.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одна из мышей не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытуемый штамм бактерий считают нетоксичным.

Раздел 4. Токсигенность

Токсигенность бактерий фенотипически проявляется в образовании белковых токсинов (экзотоксинов), полностью или частично секретируемых в окружающую среду.

Пробоподготовка

Восстановление испытуемого производственного штамма бактерий (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы бактерий в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной жидкой питательной среде

при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 10 сут для накопления в среде токсина (в случае токсигенности штамма бактерий). По истечению срока культивирования пробирку с выросшей культурой центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30 мин, либо фильтруют через бактериальный фильтр. Полученную надосадочную жидкость или фильтрат (неразведенный токсин) используют в следующих тест-дозах: 0,1; 0,5; 1,0 мл.

Методика испытания

Определение токсигенности испытуемого штамма бактерий осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз надосадочной жидкости или фильтрата.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. В опыте на одну тест-дозу используют 10 мышей. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Полученную надосадочную жидкость или фильтрат вводят мышам внутрибрюшинно в тест-дозах 0,1; 0,5; 1,0 мл. Контролем служит группа мышей, получавших стерильную жидкую среду в том же объеме.

За животными наблюдают ежедневно в течение 5 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания) отмечая в протоколе опыта количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышей.

Учет и интерпретация результатов

Испытуемый штамм бактерий выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- не погибает ни одно из подопытных животных,
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации

- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела животных, испытание повторяют на удвоенном количестве мышей. Если при повторном испытании ни одно из животных не погибает и их групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытуемый штамм бактерий считают нетоксигенным.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Биологические методы испытания
препаратов интерферона
с использованием культур клеток**

ОФС.1.7.2.0002.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования к биологическим методам испытаний препаратов интерферона с использованием клеточных культур и распространяется на субстанции и лекарственные формы интерферона человеческого всех типов природного и генно-инженерного происхождения.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологические методы с использованием клеточных культур применяют для определения следующих показателей качества препаратов интерферона:

1. Специфическая активность
2. Подлинность

Методы определения специфической активности и подлинности основаны на способности интерферона подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток в сравнении со стандартным образцом интерферона (СО). Испытания проводят с использованием соответствующих линий клеток, чувствительных к определенному типу интерферона и к индикаторному вирусу.

Наиболее часто используют следующие комбинации клетка/вирус:

- линия клеток карциномы легкого человека А-549, линия клеток почки африканской зеленой мартышки *Vero*, линия клеток карциномы гор-

тани человека Herp-2с, линия клеток фибробластов мыши L-929/ вирус энцефаломиокардита мышей (EMCV);

- клетки бычьих почек Madin-Darby MDBK, линия клеток почки африканской зеленой мартышки *Vero*, линия лимфоидных клеток человека Л-41, линия клеток карциномы легкого человека А-549, линия клеток фибробластов мыши L-929, линия клеток амниона человека WISH/ вирус везикулярного стоматита (VSV);
- клетки фибробластов человека/ вирус леса Семлики (SFV), вирус Синдбис (virus Sindbis) или иные.

Выбор комбинации «клеточная культура/вирус» основывается на том, какая из них обеспечивает наиболее чувствительный ответ для определяемого типа интерферона.

В качестве СО может быть использован международный стандартный образец активности интерферона соответствующего типа или стандартный образец, откалиброванный в Международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандарту.

Испытания проводят в асептических условиях.

Подготовка к испытаниям

Клетки. Требования к клеточным линиям (общие условия культивирования и пересева клеток, пассаж, на котором клетки проявляют оптимальную эффективность при проведении испытания, допустимый предел жизнеспособности клеток при пересевах и при взятии клеточной суспензии в испытание, процент сформированного монослоя) указывают в нормативной документации.

Испытуемые образцы препарата. Пробоподготовку испытуемых образцов проводят в соответствии с указаниями, приведенными в нормативной документации. Для некоторых лекарственных форм препаратов интерферона (суппозитории, мази, гели и т.д.) при пробоподготовке необходимо экстрагирование активного вещества (интерферона) в раствор, с соблюдением сле-

дующих условий: используемые реагенты не должны оказывать токсического действия на культуру клеток в разведениях, необходимых для исследования; использование реагентов для экстрагирования должно быть обоснованным.

Индикаторный вирус. Суспензию индикаторного вируса готовят в соответствии с указаниями в нормативной документации на лекарственное средство, содержащее интерферон. Титр вируса должен быть не менее 10^5 ТЦД/мл.

Реагенты и питательные среды.

К составу питательных сред, предназначенных для культур клеток животных и человека, предъявляют определенные требования. Для приготовления питательных сред обычно используются солевые растворы Эрла и Хенкса. Возможно использование стандартных коммерческих сред для ведения культур клеток: Игла MEM, MEM, DMEM (двойная модификация среды Игла), среды 199, среды RPMI и др. Для стимуляции роста, прикрепления и деления клеток обычно добавляют 5 – 10 % инаktivированной сыворотки коров/крупного рогатого скота. В среду для разведений интерферона добавляют 2 – 5 % сыворотки. Для обеспечения бактериологической стерильности в питательные среды вводят антибиотики: пенициллин (натриевая соль), стрептомицин (хлоркальциевый комплекс) из расчета 100—200 ЕД каждого на 1 мл среды, микостатин (нистатин) из расчета 20—25 ЕД на 1 мл или гентамицин (конечная концентрация 10 мкг/мл). Содержание L-глутамина в питательной среде должно быть около 292 мг/л.

В качестве поддерживающей среды обычно используют питательную среду без сыворотки с добавлением антибиотиков и L-глутамина.

Постоянство pH среды является одним из главных условий культивирования. Другим важным условием культивирования является осмотическое давление. Диапазоны pH и осмоляльности, при которых происходит размножение клеток, узки и варьируют в зависимости от типа клеток.

Оценить количество жизнеспособных клеток возможно при помощи

красителей: метиленового синего, кристаллического фиолетового, тиазолинового синего (МТТ), Аламара голубого и других.

Раздел 1. Специфическая активность

Противовирусную активность интерферона определяют путем сравнения защитного действия испытуемого препарата (ИП) с аналогичным действием стандартного образца активности интерферона (СО).

Проведение испытания

Определение специфической активности препаратов интерферона проводят на монослой культур клеток, полученном при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ в лунках 96-луночных плоскодонных культуральных планшетов.

Количество клеток, вносимых в каждую лунку планшета, должно быть достаточным для дальнейшего экспоненциального роста клеточной культуры и образования полноценного монослоя при вышеуказанных условиях культивирования в течение 24-48 ч.

Готовят серию разведений испытуемого препарата в среде для разведений интерферона с содержанием 2 – 5 % сыворотки (на 4 разведения выше и ниже предполагаемого титра активности). Параллельно готовят такие же разведения СО в среде для разведения интерферона. Рабочие разведения ИП и СО должны быть указаны в нормативной документации.

Из лунок планшетов с клеточным монослоем удаляют ростовую среду и вносят приготовленные разведения ИП и соответствующего СО, используя на каждое разведение не менее 4-х лунок с культурой клеток.

Возможно внесение ИП и СО в лунки планшета до внесения культуры клеток. В этом случае клеточный монослой будет формироваться с внесённым интерфероном.

Для контроля дозы индикаторного вируса оставляют 16 лунок с культурой клеток, а для контроля состояния монослоя клеток – 4 лунки. В эти 20 лунок вносят поддерживающую среду.

96-луночные планшеты с культурой клеток, разведениями ИП и СО инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$. Затем в каждую лунку с ИП и соответствующим СО вносят вирусную суспензию, содержащую рассчитанную заранее дозу индикаторного вируса – 100 ТЦД_{50} . В лунки контроля клеток вносят такой же объем поддерживающей среды.

Определение дозы вируса-индикатора

Определение дозы индикаторного вируса начинают с установления его активности.

Для определения активности вируса-индикатора готовят десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде (от 10^{-1} до 10^{-8}). Из лунок 96-луночного планшета с клеточным монослоем удаляют ростовую среду. После этого вносят в лунки планшета, используемые для определения дозы вируса, поддерживающую среду в объеме, равном объему испытуемого образца. Затем вносят приготовленные разведения индикаторного вируса (не менее, чем по 4 лунки на каждое разведение) в объеме, равном объему внесенной до этого поддерживающей среды. 96-луночный планшет с разведениями вируса инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$. За титр (активность) вируса принимают величину, обратную разведению вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. Титр вируса выражают в тканевых цитопатических дозах – $\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Активность вируса вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\lg ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \cdot \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

где: $\lg ED_{50}$ – десятичный логарифм титра вируса;

$D_{\max}$ – десятичный логарифм разведения, ниже которого произошла 100 % гибель клеток (+);

d – десятичный логарифм интервала между разведениями ($=1,0$);

n – число лунок, приходящееся на каждое разведение вируса ($=4$);

p – число лунок, давших гибель (+) в разведении, ниже которого произошла 100 % гибель клеток, и последующих разведениях.

После установления активности вируса производят подсчёт дозы для последующего внесения в лунки с испытуемым препаратом (100 ТЦД_{50}).

Одновременно с внесением вируса-индикатора осуществляют контроль взятой дозы вируса на 16-ти лунках с культурой клеток (по 4 лунки на каждое разведение вируса).

Вносят вирус, начиная с разведения, соответствующего 100 ТЦД_{50} , и до разведения, соответствующего $0,1 \text{ ТЦД}_{50}$ с коэффициентом разведения равным 10.

Лунки с культурой клеток для оценки состояния монослоя клеток остаются интактными.

После внесения индикаторного вируса в дозе 100 ТЦД_{50} 96-луночный планшет инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ до появления первых признаков цитопатических изменений в клеточном монослое с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД_{50} . Монослой в лунках с $0,1 \text{ ТЦД}_{50}$ индикаторного вируса должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках.

Учёт активности интерферона осуществляют через 24-48 ч при выполнении следующих условий:

- доза внесённого вируса соответствует 100 ТЦД_{50} ;
- в лунках с клетками и минимальными концентрациями ИП и СО, заражёнными индикаторным вирусом, наблюдается практически полный цитопатический эффект (80 – 100 %);
- в лунках с контролем клеток отсутствуют признаки дегенерации.

Учёт активности интерферона осуществляют визуально или инструментально.

Визуальный учет активности интерферона производится микроскопически при 100-кратном увеличении через 24-48 ч после внесения индикаторного вируса. За титр интерферона принимают величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50 % лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса.

Титр интерферона вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \cdot \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

где: $D_{\max}$ – двоичный логарифм разведения, ниже которого произошла 100 % защита (–);

d – двоичный логарифм интервала между разведениями (=1,0);

n – число лунок на каждую дозу (=4);

p – число лунок, давших защиту (–) в разведении, ниже которого произошла 100 % защита, и последующих разведениях.

Противовирусную активность интерферона (A_x) в исследуемом образце в МЕ вычисляют по формуле:

$$A_x = \frac{A_{co}}{a_{co}} \cdot a_x,$$

где: A_{co} – противовирусная активность СО интерферона в МЕ;

a_x – титр ИП;

a_{co} – титр СО.

Инструментальный учет активности интерферона предполагает селективное окрашивание живых клеток, защищенных интерфероном от действия вируса, элюирование красителя, фотометрирование оптической плотности элюата и статистическую обработку результатов с помощью метода параллельных линий.

Как правило, результаты исследования снижения цитопатического эффекта соответствуют сигмоидальному графику доза-ответ: зависимость значений оптической плотности элюата ИП и СО от логарифма их разведения.

При расчете активности интерферона по сигмоидальным кривым ИП и СО должны быть соблюдены следующие условия:

- Измеренные оптические плотности для ИП и СО должны находиться в одном диапазоне оптических единиц, ограниченном значениями оптической плотности, измеренными в лунках контроля клеток и вируса;
- Полученные данные должны отвечать требованиям к параллельности, линейности и величине угла наклона кривых доза-ответ для СО и ИП, указанным в нормативной документации.

Используя линейный участок графика, рассчитывают титр ИП и СО, а затем рассчитывают активность интерферона по формуле:

$$A_x = \frac{A_{CO}}{a_{CO}} \cdot a_x,$$

где: A_{CO} – противовирусная активность СО интерферона в МЕ;

a_x – титр ИП, то есть разведение ИП, в котором наблюдается 50 %-е поражение клеточного монослоя индикаторным вирусом;

a_{CO} – титр СО, то есть разведение СО, в котором наблюдается 50 %-е поражение клеточного монослоя индикаторным вирусом.

Описание инструментального метода приводят в нормативной документации.

Раздел 2. Подлинность

Подлинность препаратов интерферона определяют путем нейтрализации противовирусной активности ИП моно- или поликлональными антителами против соответствующего типа интерферона, предусмотренными в нормативной документации на препарат. Реакцию нейтрализации противови-

русной активности ИП проводят в культуре клеток, чувствительных к данному типу интерферона, в присутствии индикаторного вируса.

Проведение испытания

Определение подлинности препаратов интерферона проводят на монослое культур клеток.

Количество клеток, вносимых в каждую лунку 96-луночных культуральных планшетов, должно быть достаточным для дальнейшего экспоненциального роста клеточной культуры и образования полноценного монослоя в условиях культивирования при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ в течение 24-48 ч.

Готовят рабочие дозы ИП и СО. Для этого их разводят средой для разведения интерферона с содержанием 2 – 5 % сыворотки до одной десятой титра противовирусной активности (раздел «Специфическая активность»).

Нейтрализующие антитела разводят средой для разведения до концентраций, указанных в нормативной документации.

Для приготовления нейтрализованной смеси подготовленные разведения антител объединяют в равных объемах с рабочими дозами ИП и СО. Полученную смесь инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ в течение 1 ч.

Из лунок 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток удаляют ростовую среду, вносят в лунки планшета нейтрализованную смесь, не менее чем по 4 лунки на каждое разведение антител.

Нейтрализованную смесь допустимо вносить в лунки 96-луночного планшета как до внесения культуры клеток, так и после него.

Для оценки качества монослоя клеток в процессе постановки реакции нейтрализации (контроль) оставляют не менее 4 лунок, в которые не вносят нейтрализованную смесь. В этих лунках заменяют ростовую среду на поддерживающую.

Для контроля защитного действия интерферона также оставляют по 4

лунки на рабочие разведения СО и ИП без нейтрализующих антител.

Проверяют дозу вируса-индикатора как описано в разделе 1 «Специфическая активность».

Индикаторный вирус в дозе 100 ТЦД₅₀ вносят во все лунки 96-луночного планшета, кроме 4 лунок, предназначенных для контроля моно-слоя клеток.

После внесения индикаторного вируса в лунки с культурой клеток планшеты инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ до появления первых признаков цитопатических изменений в клетках с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀ (обычно в течение 24-48 ч). Моно-слой в лунках с 0,1 ТЦД₅₀ индикаторного вируса должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках.

Учет и интерпретация результатов

Учёт результатов осуществляют при выполнении следующих условий:

- доза внесённого вируса соответствует 100 ТЦД₅₀;
- отсутствуют признаки дегенерации в контроле клеток и в лунках с рабочими разведениями СО и ИП без нейтрализующих антител.

Нейтрализация активности испытуемого образца анти-интерфероновыми антителами в сравнении с СО в аналогичном разведении свидетельствует о том, что в испытуемом образце содержится интерферон соответствующего типа.

Подробное описание проведения реакции нейтрализации приводят в нормативной документации.

**Иммуногенность адсорбированного
дифтерийного анатоксина**

**ОФС.1.7.2.0003.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения специфической (иммуногенной) активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, входящего в состав комбинированных вакцин. Специфическую активность дифтерийного анатоксина определяют по его способности защищать иммунизированных животных от заражения дифтерийным токсином и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в 1 мл или в прививочной дозе (0,5 мл). Специфическую активность дифтерийного анатоксина в МЕ/мл рассчитывают путем сопоставления его количества и количества соответствующего референс-препарата, калиброванного в МЕ, необходимых для защиты 50 % животных от летального заражения дифтерийным токсином (LD_{50}). Для определения специфической активности используют метод множественных разведений. При стабильно воспроизводимых показателях специфической активности адсорбированного дифтерийного анатоксина и стандартной технологии производства возможно использование метода с одним разведением.

Метод множественных разведений

Разными дозами вакцины иммунизируют не менее 3 групп по 10 морских свинок в каждой группе. Не менее 3 аналогичных групп животных иммунизируют разными дозами референс-препарата, калиброванного в МЕ. Разведения вакцины и референс-препарата выбирают таким образом, чтобы

наименьшая доза защищала от заражения не более 20 %, а наибольшая доза – не менее 80 % иммунизированных животных. Следует избегать разведений испытуемых образцов, при которых наблюдается гибель или выживаемость 100 % иммунизированных животных.

Через 28 - 30 сут иммунизированным животным вводят по 100 LD₅₀ дифтерийного токсина. Наблюдение проводят в течение 5 сут, регистрируя число выживших животных в каждой группе, и рассчитывают для вакцины и референс-препарата величины ED₅₀ (статистически определяемая доза вакцины или референс-препарата, защищающая от гибели 50% иммунизированных животных в течение 4 сут). На основании полученных результатов определяют количество МЕ в 1 мл вакцины.

Материалы и животные:

- референс-препарат (стандартный образец активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу);
- испытуемая вакцина;
- дифтерийный токсин с предварительно установленной дозой LD₅₀ (статистически определяемая доза токсина, вызывающая гибель 50 % животных в течение 4 сут);
- морские свинки массой 250 – 350 г обоего пола.

Примечания.

1. Приготовление разведений референс-препарата. Референс-препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (рН 7,0 ± 0,2) и готовят не менее 3 последовательных разведений с двойным шагом (например: 1, 2 и 4 МЕ/мл).

2. Приготовление разведений вакцины. Разведения вакцины готовят, соблюдая те же условия, что и при приготовлении разведений референс-препарата.

Иммунизация животных

Разведения референс-препарата и вакцины вводят морским свинкам по 1 мл подкожно в бок.

Введение дифтерийного токсина

По истечении 28 сут всем иммунизированным животным вводят подкожно в область грудины 1 мл дифтерийного токсина, содержащего 100 LD₅₀. Опыт сопровождают контролем величины LD₅₀ дифтерийного токсина. Для этого неиммунизированным морским свинкам из той же партии, разделенным на 3 группы (не менее 5 свинок в каждой группе), вводят дифтерийный токсин в дозах 0,5, 1 и 2 LD₅₀. За иммунизированными животными и животными контрольной группы наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших в каждой группе.

На основании полученных результатов производят расчет иммуногенной активности дифтерийного анатоксина с помощью статистических программ, включающих *Probit analysis*, или по формуле Кербера, определяя величины ED₅₀ для референс-препарата (в МЕ) и испытуемой вакцины (в мл).

Формула Кербера:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \sigma(\Sigma Li - 0,5),$$

где: D_N – величина максимальной из испытанных доз;

σ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);

Li – отношение количества выживших животных к общему числу животных, получивших данную дозу;

ΣLi – сумма значений Li, найденных для всех испытуемых доз.

LD₅₀ токсина рассчитывают по той же формуле, в которой

Li – отношение количества павших к общему числу животных, получивших данную дозу токсина.

Испытание считается проведенным правильно, если:

- вычисленные значения ED_{50} для вакцины и референс-препарата находятся между значениями наибольшей и наименьшей дозы препаратов, введенных животным;
- пределы доверительного интервала ($P = 0,95$) не менее 50 % и не более 200 % от величины вычисленной активности;
- разрешающая доза введенного дифтерийного токсина приблизительно равна $100 LD_{50}$.

Метод с одним разведением

Если при испытании не менее 10 серий вакцины подтверждена стабильность и соответствие требованиям нормативной документации показателя иммуногенности дифтерийного анатоксина, возможно использование метода с одним разведением. Принцип метода заключается в сравнении активности единичных разведений вакцины и референс-препарата, калиброванного в МЕ.

По результатам ранее проведенных испытаний с 3 разведениями выбирают дозу референс-препарата, обеспечивающую выживаемость 10–20 % иммунизированных животных при заражении разрешающей дозой токсина. Разведение вакцины осуществляют с таким расчетом, чтобы получить подтверждение того, что ее активность значительно выше минимально требуемой.

Животных делят на 2 группы (не менее 12 животных в каждой), одну из которых иммунизируют вакциной, а другую—референс-препаратом. Препараты вводят подкожно в объеме 1 мл. Через 28 сут всем иммунизированным животным вводят разрешающую дозу дифтерийного токсина, равную $100 LD_{50}$, в объеме 1 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} дифтерийного токсина. За животными наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших в каждой группе. Результаты выражают как

отношение числа выживших к общему числу морских свинок в группе, иммунизированных вакциной или референс-препаратом. В опытной группе количество выживших животных должно быть достоверно выше, чем в контроле. Достоверность различия определяют с помощью точного критерия Фишера (одностороннего, $P < 0,05$). При значении $P \geq 0,05$ различия считаются недостоверными (табл.).

Таблица — Расчет значения доверительного интервала (P)

Группа	Количество испытуемых животных		
	Выжило	Пало	Всего
Опыт	a	b	T
Контроль	c	d	R
Всего	n+	n	N

Вычисление P проводят по формуле:

$$P = \frac{(n+)! (n-)! T! R!}{a! b! c! d! N!},$$

где: ! — знак факториала (означает произведение всех натуральных чисел от 1 до числа, стоящего перед знаком «!» включительно).

Если показатель иммуногенности дифтерийного анатоксина при испытании методом с одним разведением не соответствует требованиям нормативной документации, испытание повторяют методом множественных разведений.

**Иммуногенность адсорбированного
столбнячного анатоксина**

**ОФС.1.7.2.0004.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения специфической (иммуногенной) активности адсорбированного столбнячного анатоксина, входящего в состав моно- и комбинированных вакцин. Специфическую активность столбнячного анатоксина определяют по его способности защищать иммунизированных животных от заражения столбнячным токсином и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в 1 мл или 1 прививочной дозе (0,5 мл). Активность столбнячного анатоксина в МЕ/мл рассчитывают путем сопоставления его количества и количества соответствующего референс-препарата, калиброванного в МЕ, необходимых для защиты 50 % животных от летального заражения столбнячным токсином (LD_{50}). Для определения специфической активности используют метод множественных разведений. При стабильно воспроизводимых показателях активности адсорбированного столбнячного анатоксина и стандартной технологии производства возможно использование метода с одним разведением.

Метод множественных разведений

Разными дозами испытуемого препарата иммунизируют не менее 3 групп мышей по 12–16 животных в группе. Не менее 3 аналогичных групп животных иммунизируют разными дозами референс-препарата, калиброванного в МЕ. Разведения вакцины и референс-препаратов выбирают таким образом, чтобы наименьшая доза защищала от заражения не более 20

%, а наибольшая доза – не менее 80 % иммунизированных животных. Следует избегать разведений испытуемых образцов, при которых наблюдается гибель или выживаемость 100 % иммунизированных животных.

Через 28 сут животным вводят по 50 LD₅₀ столбнячного токсина. Наблюдение проводят в течение 4 сут, регистрируя число выживших животных, и рассчитывают величины ED₅₀ (статистически определяемая доза вакцины или референс-препарата, защищающая от гибели 50 % иммунизированных животных в течение 4 сут) для вакцины (в мл) и референс-препарата (в МЕ). На основании полученных результатов определяют количество МЕ в 1 мл вакцины.

Материалы и животные:

–референс-препарат (стандартный образец активности адсорбированного столбнячного анатоксина, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу);

– испытуемый образец;

– столбнячный токсин с предварительно установленной дозой LD₅₀ (статистически определяемая доза токсина, вызывающая гибель 50 % животных в течение 4 сут);

– белые мыши с массой тела 16–18 г.

Примечания.

1. Приготовление разведений референс-препарата. Референс-препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, рН (7,0±0,2), и готовят не менее 3 последовательных разведений с двойным шагом (например: 0,5, 1,0 и 2 МЕ/0,5 мл).

2. Приготовление разведений испытуемого образца вакцины. Разведения испытуемого образца готовят, соблюдая те же условия, что и при приготовлении разведений референс-препарата.

Иммунизация животных

Разведения референс-препарата и испытуемого образца анатоксина вводят по 0,5 мл мышам в соответствующих группах однократно под кожу в область внутренней поверхности верхней трети бедра.

Введение столбнячного токсина

По истечении 28 сут всем иммунизированным животным вводят под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра по (50 ± 10) LD₅₀ столбнячного токсина в объеме 0,5 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD₅₀ столбнячного токсина. Для этого неиммунизированным мышам из той же партии, разделенным на 3 группы (не менее 4 мышей в каждой группе), вводят столбнячный токсин в дозах 0,5, 1 и 2 LD₅₀. За иммунизированными животными и животными контрольной группы наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших мышей без явлений столбняка.

На основании полученных результатов производят расчет иммуногенной активности столбнячного анатоксина с помощью статистических программ, включающих *Probit analysis*, или по формуле Кербера, определяя величины ED₅₀ для референс-препарата и испытуемой вакцины. Также рассчитывают количество LD₅₀ токсина, введенного иммунизированным животным.

Формула Кербера:

– для испытуемого образца и референс-препарата:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \sigma(\sum Li - 0,5),$$

– для токсина:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \sigma(\sum Li - 0,5),$$

где: D_N – величина максимальной из испытуемых доз;

σ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);

Li – отношение количества выживших мышей без явлений столбняка (для LD₅₀ – павших) к общему числу животных, получивших данную дозу;

Σ Li – сумма значений Li, найденных для всех испытуемых доз.

Испытание считается проведенным правильно, если:

- вычисленное значение ED_{50} для испытуемого образца анатоксина и референс-препарата лежит между значениями наибольшей и наименьшей дозы препаратов, введенных животным;
- пределы доверительного интервала ($P = 0,95$) не менее 50 % и не более 200 % от величины вычисленной активности;
- разрешающая доза столбнячного токсина приблизительно равна 50 LD_{50} .

Метод с одним разведением

Если при испытании не менее 10 серий вакцины подтверждена стабильность и соответствие требованиям нормативной документации показателя иммуногенности столбнячного анатоксина, возможно использование метода с одним разведением. Принцип метода заключается в сравнении активности единичных разведений вакцины и референс-препарата, калиброванного в МЕ.

По данным тестов с 3 разведениями выбирают дозу референс-препарата, обеспечивающую выживаемость 10–20 % иммунизированных животных при заражении разрешающей дозой токсина. Разведение вакцины готовят с таким расчетом, чтобы получить подтверждение того, что ее активность значительно выше минимально требуемой.

Животных делят на 2 группы (не менее 12 животных в каждой), одну из которых иммунизируют вакциной, а другую – референс-препаратом. Препараты вводят подкожно в объеме 0,5 мл. Через 28 сут всем иммунизированным животным вводят разрешающую дозу столбнячного токсина (50 ± 10) LD_{50} в объеме 0,5 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} столбнячного токсина. За животными наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших животных без явлений столбняка в каждой группе. Результаты выражают как отношение числа выживших без явлений столбняка мышей в каждой группе к общему числу животных, получивших данную дозу вакцины или референс-препарата. В опытной группе количество

выживших животных должно быть достоверно выше, чем в контроле. Достоверность различия определяют с помощью точного критерия Фишера (одностороннего, $P < 0,05$). При значении $P \geq 0,05$ различия считаются недостоверными (табл).

Таблица – Расчет значения доверительного интервала (P)

Группа	Количество испытуемых животных		
	Выжило	Пало	Всего
Опыт	a	b	T
Контроль	c	d	R
Всего	n+	n–	N

Вычисление P проводят по формуле:

$$P = \frac{(n+)!(n-)! T! R!}{a! b! c! d! N!},$$

где: ! – знак факториала (означает произведение всех натуральных чисел от 1 до числа, стоящего перед знаком «!» включительно).

Если показатель иммуногенности столбнячного анатоксина при испытании методом с одним разведением не соответствует требованиям нормативной документации, испытание повторяют методом множественных разведений.

**Иммуногенность коклюшной суспензии
и цельноклеточного коклюшного
компонента комбинированных вакцин**

ОФС.1.7.2.0005.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения иммуногенности коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин путем сравнения с иммуногенностью референс-препарата коклюшной вакцины, откалиброванного в международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандартному образцу. Определение проводят на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *Bordetella pertussis* 18323 по методу Kendrick.

Материалы

Животные. Здоровые мыши с массой тела (11 ± 1) г чувствительной линии или аутбредные мыши, способные давать адекватный иммунный ответ. Используют мышей одного пола или самцов и самок, равномерно распределенных по группам. В 1 опыте различия массы тела отдельных животных не должны превышать 2 г. Перед проведением испытания за животными проводят наблюдение в течение 3 сут. При гибели более 10 % мышей данную партию не используют.

Референс-препараты:

– стандартный образец иммуногенности коклюшной вакцины, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу;

– стандартный образец мутности 10 МЕ, калиброванный в международных оптических единицах (МЕ).

Тест-штамм. *B. pertussis* 18323, хранят в лиофилизированном состоянии. Продолжительность хранения высушенного штамма не должна превышать 10 лет; биологические свойства лиофилизированного тест-штамма проверяют ежегодно.

Среды. Используют среды Борде-Жангу, казеиново-угольный агар (КУА), их модификации или другие среды, адаптированные к коклюшному микробу.

Среда Борде-Жангу

В 1500 мл воды очищенной последовательно растворяют ингредиенты:

- калий фосфорнокислый двузамещенный – 2,25 г,
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,75 г,
- калий хлористый – 1,5 г,
- магний сернокислый – 0,075 г,
- натрий хлористый – 7,5 г.

Полученный солевой раствор до внесения следующих ингредиентов должен иметь рН 7,4–7,5.

Затем в солевой раствор вносят:

- фильтрат картофельного отвара – 500 мл,
- агар зарубежных фирм «Дифко» (США) или «Мерк» (Германия) – 60 г.

Среду кипятят до полного растворения агара, устанавливают рН 7,1–7,2, разливают по (200 ± 5) мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл и стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин. Среду Борде-Жангу хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 3 мес.

Фильтрат картофельного отвара

В 1 л воды очищенной вносят 0,5 кг очищенного мелко нарезанного картофеля и нагревают до кипения. В момент закипания добавляют 40 мл глицерина и кипятят в закрытой посуде до полного разваривания картофеля

в течение 1,0–1,5 ч. Доводят объем водой очищенной до первоначального уровня и процеживают через двухслойную марлевую салфетку. Картофельный отвар используют свежеприготовленным.

Для получения среды Борде-Жангу с 30 % крови содержимое флакона нагревают до температуры 50–55 °С, вносят 60 мл дефибринированной крови человека, перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды с кровью – 10 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Примечание.

Дефибринированную кровь получают на участках заготовки крови, где ее контролируют на отсутствие возбудителей инфекций, которые передаются при гемотрансфузиях, в соответствии с утвержденными уполномоченными органами РФ «Инструкцией по заготовке и консервированию донорской крови» и «Инструкцией по проведению донорского прерывистого плазмафереза». Срок хранения крови не более 2 сут.

Среда КУА (казеиново-угольный агар)

На 1 л среды добавляют:

- гидролизат казеина – (170 ± 5) мл (берется из расчета, чтобы в готовой среде содержание аминного азота составляло от 150 до 160 мг%),
- дрожжевой диализат – (90 ± 10) мл,
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,5 г,
- магний хлористый 6-водный – 0,4 г,
- крахмал растворимый – 1,5 г,
- кальций хлористый – 0,01 г или 1 % раствор – 1 мл,
- железо сернокислое 7-водное – 0,01 г или 0,5 % раствор – 2 мл,
- медь сернокислая 5-водная – 0,005 г или 0,2 % раствор – 2 мл,
- цистеин – 0,03 г или 1,5 % раствор – 2 мл,
- агар микробиологический – 30,0 г,
- уголь активированный – 2 г.

Содержание хлоридов в среде должно составлять $(0,75 \pm 0,15)$ %, аминного азота $(155 \pm 10 \text{ мг } \%)$; pH среды доводят до 7,0–7,1 с помощью 20

% раствора натрия гидроксида.

Среду разливают в матрасы по (250 ± 10) мл, пробирки по (11 ± 1) мл и флаконы вместимостью 500 мл по (200 ± 5) мл, стерилизуют 30 мин при температуре 110°C и хранят при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес. Для получения среды с 10 % крови содержимое флакона растапливают, охлаждают до температуры $50\text{--}55^\circ\text{C}$, вносят 20 мл дефибринированной крови человека и перемешивают. Срок хранения среды с кровью 10 сут при температуре от 2 до 8°C .

Гидролизат казеина:

- казеин (сухой) – 2000 г,
- хлористоводородная кислота концентрированная – 1000 мл,
- вода очищенная – 500 мл.

Степень расщепления белка – не менее 93 %. Аминный азот 850–1000 мг %, общий азот 910–1080 мг %, натрия хлорид 4–6 %. Среду стерилизуют 30 мин при температуре 110°C . Среду используют свежеприготовленной (при добавлении 0,5 % хлороформа срок хранения 1 год при температуре от 2 до 8°C).

Дрожжевой диализат:

- дрожжи хлебопекарные – 1000 г,
- вода очищенная – 1000 мл,
- хлороформ – 4 мл.

Аминный азот – не менее 0,54 мг/мл. Срок хранения 3 мес при температуре от 2 до 8°C .

1 % раствор гидролизата казеина

Гидролизат казеина – 10 мл (аминный азот 8,5–10,0 мг/мл), натрий хлористый – 6,0 г (до концентрации хлоридов 0,6 %), вода очищенная – до 1000 мл. С помощью 20 % раствора натрия гидроксида pH доводят до $(7,1 \pm 0,2)$. Среду стерилизуют 15 мин при температуре 121°C . Срок хранения 6 мес. Каждую серию гидролизата казеина проверяют на безвредность путем

внутрибрюшного введения 5 мышам по 0,03 мл. Животные должны оставаться живыми и здоровыми в течение 3 сут.

Метод исследования иммуногенной активности коклюшной вакцины

Мышей распределяют в группы по 18–20 животных в каждой: по 2 группы для испытуемого и референс-препаратов. Одновременно для контроля вирулентности заражающего штамма *B. pertussis* 18323 (определение LD₅₀ культуры) из этой же партии животных формируют 4 группы по 10 мышей в каждой.

Необходимо соблюдать принцип случайного распределения животных по группам, случайными должны быть и расположение клеток на полках, и порядок введения разрешающей дозы.

Иммунизация мышей

Готовят по 3 пятикратных разведения испытуемого и референс-препаратов. В качестве растворителя используют 0,9 % раствор натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,2). В интервале используемых разведений каждого образца должна содержаться средняя эффективная доза ED₅₀.

В ампулу с референс-препаратом вносят стерильный растворитель из такого расчета, чтобы в 1 мл содержалась 1 МЕ (разведение I). Из разведения I делают 2 последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 1).

Таблица 1– Пример разведения референс-препарата

Разведение	Объем вносимого разведения I референс-препарата, мл	Объем вносимого растворителя, мл	Разведения референс-препарата (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза– 0,5мл	
				Количество исходного референс-препарата, мл	Количество МЕ
I	15	0	1:60	0,0167	0,5
II	2,5	10,0	1:300	0,0033	0,1
III	0,5	12,0	1:1500	0,00066	0,02

Образец испытуемой вакцины разводят в 14 раз (разведение I). Из разведения I делают 2 последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 2). Если полученное в опыте значение ED₅₀ испытуемой вакцины будет

больше значений использованных доз, необходимо изменить разведение I (например, 1:10). Последующие 2 разведения делают по вышеприведенной схеме.

Приготовленные разведения вакцины и референс-препарата хранят при температуре от 2 до 8 °С и используют в течение не более 4 ч.

Таблица 2 – Пример разведения испытуемой вакцины

Разведение	Объем вносимого I разведения вакцины, мл	Объем вносимого раствора, мл	Кратность разведений исходной вакцины (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза в объеме 0,5 мл	
				Количество исходной вакцины, мл	Количество МЕ (предполагаемое содержание)
I	14	0	1:28	0,0357	0,5
II	2,5	10,0	1:140	0,0071	0,1
III	0,5	12,0	1:700	0,00142	0,02

Каждой мыши в каждой группе внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл одного из разведений испытуемой вакцины или референс-препарата. К моменту введения заражающей дозы не менее 94 % иммунизированных мышей должно остаться в живых и без признаков заболевания. Если гибель животных превышает указанную величину, то опыт не подлежит учету.

Приготовление заражающей суспензии тес-штамма *B. pertussis* 18323

Бактериальную суспензию *B. pertussis* 18323, используемую для заражения, готовят из 20–24-часовой культуры второго–третьего пассажа, выращенной на среде Борде-Жангу, с кровью человека или КУА с кровью человека или на других, адаптированных к коклюшному микробу средах.

Выросшую культуру контролируют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. Микробные клетки *B. pertussis* 18323 должны быть морфологически однородны. Посторонняя микрофлора должна отсутствовать.

Готовят бактериальную суспензию микробных клеток с концентрацией, соответствующей 10 МЕ по стандартному образцу мутности

(разведение 1_A). Все дальнейшие разведения микробной суспензии делают в 1% растворе гидролизата казеина, содержащего 0,6% раствор натрия хлорида, pH ($7,1 \pm 0,2$).

Полученную суспензию разводят последовательно так, чтобы получить заражающую дозу, содержащую 100000 микробных клеток (рабочая суспензия) в объеме 0,03 мл ($100-1000 LD_{50}$). Из рабочей суспензии готовят разведения 1/10, 1/50, 1/250 и 1/1250 для определения LD_{50} тест-штамма и проверки жизнеспособности микробов в суспензии (табл. 3).

Таблица 3 – Пример разведения тест-штамма *B. pertussis* 18323

Номер пробирки	Кратность разведения	Объем переносимой суспензии из предыдущей пробирки в последующую, мл	Объем внесенного растворителя, мл	Полученная суспензия содержит в 0,03 мл (эквивалентно)	Назначение
1	$1_A : 3$	1	2	100 млн	
2	$1_1 : 10$	0,5	4,5	10 млн	
3	$1_2 : 10$	0,5	4,5	1 млн	
4	$1_3 : 10$	2	18	100000	Разливают в 3 пробирки для заражения – рабочая суспензия
5	$1_4 : 10$	0,5	4,5	10000	Для определения LD_{50} штамма
6	$1_5 : 5$	1,0	4,0	2000	
7	$1_6 : 5$	1,0	4,0	400	
8	$1_7 : 5$	1,0	4,0	80	

Из пробирки 8 сразу после приготовления разведения делают посев по 0,1 мл на 3 чашки Петри со средой Борде-Жангу или КУА с кровью с целью подсчета количества содержащихся в ней живых клеток, выраженного в колониеобразующих единицах (КОЕ). Культуру помещают в термостат с температурой ($36 \pm 0,5$) °C на 3–4 сут. Для определения количества КОЕ в 30 мкл проводят подсчет выросших колоний на 3 чашках и полученное значение делят на 10. В 0,03 мл разведения из пробирки 8 должно быть не более 50 КОЕ.

При разведении и в процессе заражения суспензию хранят в холодной водяной бане (вода со льдом). Продолжительность работы с микробной суспензией не должна превышать 2,5 ч с момента приготовления смыва культуры.

Если в испытании используют высокочувствительную к коклюшным антигенам линию мышей, то заражающую дозу тест-штамма 18323 следует уменьшить до содержания 100–1000 LD₅₀ в объеме 0,03 мл.

Заражение иммунизированных животных

Мышам, иммунизированным испытуемой вакциной и референс-препаратом, через 14–17 сут интрацеребрально вводят по 0,03 мл рабочей суспензии живой культуры тест-штамма *B. pertussis* 18323 (пробирка 4) путем прокола лобной кости в точке, расположенной в 2 мм от средней линии и на 2 мм выше глаза. Для заражения используют туберкулиновые шприцы с ценой деления 0,01 мл, используя иглу № 27, имеющую короткий срез и муфту; длина свободного конца иглы от края муфты до среза должна составлять от 3 до 4 мм. Для определения величины LD₅₀ разведения заражающей дозы (пробирки 5, 6, 7, 8) вводят контрольным мышам соответствующих групп интрацеребрально по 0,03 мл.

Мышей, погибших в течение 3 сут после заражения, исключают из опыта (неспецифическая гибель); в каждой клетке оставляют по 16 мышей.

За зараженными животными наблюдают 14 сут с ежедневной регистрацией их гибели. В день учета результатов (14-е сут) в число погибших включают также всех парализованных мышей.

Вычисление величины LD₅₀ (табл. 4) культуры тест-штамма производят по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta(\sum Li - 0,5),$$

где: D_N – максимальная из испытуемых доз;

δ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);

Li – отношение числа животных, погибших при введении данной дозы культуры, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

$\sum Li$ – сумма значений Li , найденных для всех испытанных доз.

Таблица 4 – Пример расчета величины LD_{50} культуры тест-штамма *B. pertussis* 18323

Доза культуры (число микробных клеток) 0,03 мл	Число зараженных животных	Число погибших (парализованных) из общего числа зараженных животных	Значения Li	LD_{50}	Кол-во колоний в заражающей дозе 80 клеток
10^4	10	9/10	0,9	648	23
$2 \cdot 10^3$	10	7/10	0,7		
$4 \cdot 10^2$	10	4/10	0,4		
80	10	2/10	0,2		

$\sum Li = 2,2$

$$\lg LD_{50} = \lg 10^4 - \lg 5 \cdot (2,2 - 0,5) = 4,0 - 0,699 \cdot 1,7 = 2,8117$$

$LD_{50} = 648$ микробных клеток.

В заражающей дозе (10^5 микробных клеток) содержится $648 = 154 LD_{50}$

Оценка иммуногенной активности испытуемой вакцины

Расчет иммуногенной активности испытуемого препарата проводят по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США (для $n=16$) или статистическим методом с помощью программы Probit-analysis. Для проведения расчета в таблице Вильсона-Вустера (табл. 5) по вертикальной оси отмечают величину, равную сумме выживших мышей от всех 3 доз препарата (A), по горизонтальной оси – разницу между числом мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз, взятых в опыт (B). В месте пересечения прямых, проведенных от соответствующих величин A и B, находят ED_{50} (верхняя цифра) и её стандартные отклонения, выраженные в процентах (нижние цифры). Найденное значение соответствует ED_{50} для средней иммунизирующей дозы, равной 100 мл. Для определения величины ED_{50} в опыте, найденную в таблице величину ED_{50} делят на 100 и умножают на значение средней иммунизирующей дозы в данном опыте. Результаты опыта считают

достоверными, если стандартное отклонение средней иммунизирующей дозы не ниже 64 % и не выше 157 % от найденного значения ED_{50} .

Примеры расчета количества МЕ в 1 мл по методу Вильсона и Вустера приведены в табл. 6.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Приложение

Таблица Вильсона-Вустера

[illegible]

Таблица 6 – Пример расчета иммуногенной активности вакцины

Препарат	Доза препарата в 0,5 мл			Количество выживших мышей/общее число зараженных в группе	Величины A/B и ED ₅₀ по таблице	ED ₅₀ (стандартные отклонения в опыте)
	Разведение	Количество исходного препарата, мл	Количество ME в иммунизирующей дозе			
Референс-препарат	1:60	0,0167	0,5	14/16	27/11 71,3 72–139	0,0023 (0,00327– 0,00169)
	1:300	0,0033	0,1	10/16		
	1:1500	0,00066	0,02	3/16		
Вакцина	1:28	0,0357		13/16	23/11 111,75 72–139	0,0079 (0,011– -0,0057)
	1:140	0,0071		8/16		
	1:700	0,00142		2/16		

Средняя иммунизирующая доза референс-препарата, выраженная в мл (0,0033 мл), содержит 0,1 ME (табл. 6). При определении ED₅₀ референс-препарата используют значение средней иммунизирующей дозы, выраженное в ME.

$$ED_{50 \text{ референс}} = \frac{71,3 \cdot 0,1}{100} = 0,0713 \text{ ME},$$

$$ED_{50 \text{ макс.}} = \frac{0,0713 \cdot 139}{100} = 0,0991 \text{ ME},$$

$$ED_{50 \text{ мин}} = \frac{0,0713 \cdot 72}{100} = 0,0513 \text{ ME},$$

$$ED_{50 \text{ вакцины}} = \frac{111,75 \cdot 0,0071}{100} = 0,0079 \text{ мл},$$

$$ED_{50 \text{ макс.}} = \frac{0,0079 \cdot 139}{100} = 0,011 \text{ мл},$$

$$ED_{50 \text{ мин}} = \frac{0,0079 \cdot 72}{100} = 0,0057 \text{ мл}.$$

Количество ME в 1 мл вакцины определяют по формуле:

$$X = \frac{ED_{50 \text{ референс}}}{ED_{50 \text{ вакцины}}},$$

$$X = \frac{0,0713}{0,0079} = 9,0 \text{ ME/мл}.$$

Доверительный интервал значения иммуногенности (МЕ/мл) препарата рассчитывают по формулам:

$$R_{\text{мин}} = \frac{R}{K};$$

$$R_{\text{макс}} = R \cdot K,$$

где R – количество МЕ в 1 мл препарата;

$R_{\text{мин}}$ – нижний предел доверительного интервала;

$R_{\text{макс}}$ – верхний предел доверительного интервала;

K – доверительный коэффициент.

$$K = \text{анти}lg \sqrt{(S_1^2 + S_2^2)},$$

где $S_1 = (lg \text{ ED}_{50})_{\text{макс.}} - lg \text{ ED}_{50}$ для более иммуногенного препарата при избранном уровне существенности различия – 95 или 99%;

$S_2 = lg \text{ ED}_{50} - (lg \text{ ED}_{50})_{\text{мин.}}$ для менее иммуногенного препарата.

Для примера:

$$K = \text{анти}lg \sqrt{[-2,4855 - (-2,6289)]^2 + [-2,1007 - (-2,2441)]^2} =$$

$$\text{анти}lg \sqrt{0,0206 + 0,0206} = \text{анти}lg \sqrt{0,0412} = \text{анти}lg \quad 0,203.$$

$$K=1,6$$

Отсюда:

$$R_{\text{мин}} = \frac{R}{K}; \text{ т. е. } \frac{9,0 \text{ МЕ}}{1,6} = 5,6 \text{ МЕ}$$

$$R_{\text{макс}} = R \cdot K; \text{ т. е. } 9,0 \text{ МЕ} \cdot 1,6 = 14,4 \text{ МЕ}$$

Таким образом, в 1 мл вакцины содержится 9,0 МЕ с доверительным интервалом от 5,6 до 14,4 МЕ.

Если в первом опыте активность препарата не соответствует установленным требованиям, опыт повторяют. В этом случае при вычислении количества МЕ в 1,0 мл препарата учитывают результаты всех достоверных опытов (не более 3). Используют расчет средней геометрической ($X_{\text{геом.}}$) величины значения по формуле:

$$X_{\text{геом.}} = \sqrt[n]{\Pi_x},$$

где Π_x – произведение усредняемых величин;
 n – число определений.

Критерии достоверности теста:

- ED_{50} референс-препарата и испытуемой вакцины лежит в интервале между наибольшей и наименьшей иммунизирующими дозами;
- LD_{50} не превышает 1000 микробных клеток;
- заражающая доза микробных клеток содержит не менее 100 и не более 1000 LD_{50} ;
- в 0,03 мл разведения из пробирки 8 содержится не более 50 КОЕ.

ФЭМБ
 Федеральная электронная
 медицинская библиотека

**Испытание вирусных вакцин
на присутствие посторонних агентов**

**ОФС.1.7.2.0006.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы обнаружения посторонних агентов в вирусных вакцинах для медицинского применения.

Для производства вирусных вакцин допускается использовать только субстраты, одобренные национальными регулирующими органами. Если для приготовления иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) используются ткани животных или эмбрионы птиц, а также приготовленные на их основе клеточные культуры, то животные и эмбрионы должны поступать из изолированных, постоянно контролируемых хозяйств, свободных от специфической патогенной флоры (SPF), если в нормативной документации нет других указаний.

На присутствие посторонних агентов должны быть испытаны:

- контрольные клеточные культуры (клетки, отобранные из производственного пула клеточных культур до внесения вакцинного штамма);
- объединенный вирусный сбор вакцинного и посевного вирусов для живых и инактивированных вакцин;
- объединенный вирусный сбор (полуфабрикат вакцины до добавления вспомогательных веществ) каждой серии живых вирусных вакцин.

Учитывая специфические особенности производства ИЛП, в нормативную документацию на них могут быть введены дополнительные

требования.

1. Испытание контрольной клеточной культуры

1.1. Исследование в клеточных культурах

Испытанию подвергается не менее 500 мл незараженной клеточной суспензии в концентрации, используемой для посева клеточных культур-продуцентов вакцины.

Отобранную в качестве контрольной клеточную суспензию разливают во флаконы, клетки оставляют незараженными и инкубируют в тех же условиях, что и клетки, используемые для производства вакцины. За контрольной клеточной культурой наблюдают до времени последнего сбора вирусов с культур-продуцентов вакцины, но не менее 14 сут. В конце периода наблюдения все флаконы с контрольными клеточными культурами исследуют с помощью светового микроскопа на наличие цитопатических изменений. Во время культивирования контрольных клеток не должно выявляться признаков специфической дегенерации.

По истечении срока наблюдения (после изучения монослоя под микроскопом) не менее 25 % контрольных клеточных культур проверяют на наличие феномена гемадсорбции с 0,25 % эритроцитами морской свинки, кур и человека I(0) группы, если нет других указаний в нормативной документации. Материал инкубируют в течение 30 мин сначала при температуре от 2 до 8 °C, а затем при температуре от 20 до 25 °C. Взвесь эритроцитов сливают, клеточный монослой трижды отмывают раствором Хенкса или 0,9 % раствором натрия хлорида и просматривают под микроскопом на наличие гемадсорбции.

Из оставшихся флаконов с контрольными культурами отбирают по 10 мл культуральной жидкости. Если на протяжении срока инкубации контрольных культур производят сливы вирусосодержащей жидкости из производственных культур, то в те же сроки берут пробы культуральной жидкости из флаконов с контрольными культурами и сохраняют их при температуре не выше минус 20 °C. В конце наблюдения пробы

культуральной жидкости из контрольных клеточных культур объединяют и вносят по 10 мл в 3 клеточные культуры: гомологичную, приготовленную из другой партии производственного субстрата (например, фибробласты куриных или перепелиных эмбрионов), человека или обезьяны (например, диплоидные клеточные культуры человека или клетки *Vero*) и наиболее чувствительную для выявления вирусов - возможных контаминантов используемого субстрата (для птичьего субстрата – почки эмбриона кур). От каждой вновь испытываемой клеточной культуры оставляют по одному интактному (незараженному) контрольному флакону. Все культуры выдерживают при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. По окончании срока наблюдения все контрольные культуры проверяют на наличие цитопатических изменений и феномена гемадсорбции, как указано выше.

Пробы считают прошедшими испытание, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция.

Если при исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, то вирусный сбор, полученный в производственных культурах, не должен быть использован для приготовления вакцины.

1.2. Обнаружение группно-специфического (ГС) антигена вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц (Cofal-test)

Если для производства и контроля вакцин используют субстраты, приготовленные на основе эмбрионов кур или других птиц (например, перепелов), то для обнаружения группоспецифического антигена лейкозно-саркоматозного комплекса птиц (ГС-антиген) проводят реакцию связывания комплемента (РСК) (Cofal-test) по общепринятой методике.

Испытуемый антиген готовят из той же партии контрольных клеточных культур, используемых при производстве вирусных вакцин.

Клетки засевают в три флакона (по 150-160 тыс. клеток на мл) и

инкубируют при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в смеси равных объемов питательных сред Игла и 199 с добавлением 5 % телячьей сыворотки. Через 5-7 сут после образования монослоя клетки субкультивируют не менее двух раз в течение 14 сут. По окончании инкубации культуральную жидкость из флаконов сливают, добавляют 4,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, затем клетки разрушают трехкратным замораживанием и оттаиванием и используют в РСК.

В качестве положительного контроля антигена возможно использование

10 % суспензии опухоли вируса саркомы Рауса в 0,9 % растворе натрия хлорида. При обнаружении в испытуемой культуре ГС-антигена вакцину бракуют.

Обнаружение ГС-антигена (после приготовления как указано выше) возможно также в ИФА и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению тест-систем после валидации методик.

2. Исследование вирусосодержащего материала

Испытанию подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма и посевного вируса. При необходимости для определенных вирусных вакцин испытанию также подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, что должно быть указано в нормативной документации.

Контроль проводят в клеточных культурах, на животных и куриных эмбрионах (если в нормативной документации нет других указаний). Если образцы исследуют в течение первых 24 ч, то до проведения контроля их сохраняют при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$. При проведении контроля в более поздние сроки образцы замораживают и хранят при температуре не выше минус 20 $^\circ\text{C}$. Размораживание материала в процессе контроля разрешается проводить не более одного раза.

2.1 Исследование в клеточных культурах

Если испытуемый материал вызывает в культуре цитопатогенное или гемадсорбирующее действие, используют предварительную нейтрализацию вируса иммунной сывороткой. Для получения иммунной сыворотки используют животных, ткани которых не применяют при приготовлении клеточных культур-продуцентов вакцины. Антиген для иммунизации животных готовят в клеточных культурах, не используемых для проведения контроля. Сыворотка не должна оказывать ингибирующего/токсического действия на ход анализа.

Испытуемый материал (не менее 50 мл вируссодержащей жидкости, если в нормативной документации нет других указаний) смешивают с иммунной сывороткой, взятой в количестве, достаточном для полной нейтрализации содержащегося в пробе вируса. Смесь инкубируют при заданной температуре в течение времени (обычно 1-2 ч), необходимого для нейтрализации вакцинного штамма вируса (если нет других указаний в нормативной документации), затем вносят во флаконы с тремя указанными выше видами клеточных культур. Для каждого вида культуры клеток оставляют один контрольный флакон с незараженной клеточной культурой.

Культуры клеток выдерживают при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 14 сут со сменой среды на 4 - 6 сут (если это необходимо). По истечении 14 сут опытные и контрольные клеточные культуры просматривают под микроскопом на наличие цитопатических изменений, трижды замораживают и оттаивают, после чего производят пассаж на одноименной культуре, внося в нее не менее 25 мл неосветленной культуральной жидкости. Разведение вносимого материала поддерживающей средой не должно превышать четырехкратного. Если для испытания используют перевиваемую клеточную линию, то по истечении указанного срока инкубации возможно проведение субпассажа клеток.

После проведения пассажа опытные и контрольные культуры клеток инкубируют при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут со сменой среды на

4 - 6 сут, периодически просматривая их под микроскопом на наличие цитопатических изменений. По истечении срока наблюдения культуры проверяют в реакции гемадсорбции, как указано выше. Материал считают прошедшим контроль, если в опытных и контрольных культурах отсутствуют цитопатические изменения и гемадсорбция.

2.2. Испытание на животных

Испытанию подлежит объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, что должно быть указано в нормативной документации. Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Если содержащийся в контролируемом материале вакцинный штамм вируса патогенен для животных, используемых для контроля, его предварительно нейтрализуют иммунной сывороткой, приготовленной, как было указано выше. Испытания на животных проводятся в том случае, если в нормативной документации нет других указаний.

2.2.1. Испытание на взрослых мышах

Используют от 10 до 20 мышей массой 15 - 20 г. Каждому животному вводят по 0,03 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,5 мл - интраперитонеально. За животными наблюдают от 21 до 28 сут. Все мыши, которые погибают позже 24 ч после введения материала, или с признаками заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически. Если при макроскопическом исследовании не были выявлены признаки заболевания, из внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг) готовят 10 % суспензии на 0,9 % растворе натрия хлорида и вводят их интрацеребрально и интраперитонеально не менее чем 5 мышам, в дозах, указанных выше. За животными наблюдают 21 сут.

Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных

животных и ни у одного из них не выявляют признаки, указывающие на присутствие в вакцине посторонних агентов.

2.2.2. Испытание на новорожденных мышах

Используют не менее 20 новорожденных мышей не старше 24 ч (два-три помета). Каждому животному вводят по 0,01 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 0,1 мл — интраперитонеально. За животными наблюдают 14 сут. Все мыши, которые погибают позже 24 ч наблюдений, или у которых наблюдаются признаки заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически на наличие спонтанной патологии, не связанной с введением препарата. При отсутствии патологии, из внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг) мышей готовят 10 % суспензии на 0,9 % растворе натрия хлорида и вводят интрацеребрально и интраперитонеально не менее чем 5 новорожденным мышам в дозах, указанных выше. За животными наблюдают 14 сут. Материал считается прошедшим контроль, если на протяжении периода наблюдения остаются здоровыми не менее 80% инокулированных животных и ни у одного из них не выявляются признаки, указывающие на присутствие в вакцине посторонних агентов.

2.2.3. Испытание на морских свинках

Используют не менее 5 морских свинок массой 300 - 350 г. Каждому животному вводят по 0,1 мл испытуемого материала интрацеребрально и по 5,0 мл — интраперитонеально. За животными наблюдают 42 дня. Все животные, которые погибают позднее 24 ч после введения материала или с признаками заболевания, должны быть вскрыты и исследованы макроскопически, а внутренние органы (печень, селезенка, легкие, сердце) исследуются микроскопически. Материал считают прошедшим испытание, если не менее 80 % инокулированных животных остаются здоровыми к концу периода наблюдения и ни у одного из них не наблюдается признаков вирусной или туберкулезной инфекции, связанной с введением вакцинного препарата.

3. Испытание на куриных эмбрионах

Если содержащийся в контролируемом материале вакцинный штамм вируса патогенен для куриных эмбрионов, его необходимо предварительно нейтрализовать иммунной сывороткой, как было указано выше. Испытуемый материал вводят трем группам эмбрионов (по 10 шт. в каждой группе).

Первой группе куриных эмбрионов 9-10 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл в аллантоисную полость. Эмбрионы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 6-7 сут, затем аллантоисную жидкость исследуют в реакции гемагглютинации со смесью эритроцитов морской свинки, петуха и человека I (0) группы. С этой целью готовят 5-6 последовательных двукратных разведений аллантоисной жидкости от каждого инокулированного эмбриона, добавляют равные объемы 0,5 % суспензии эритроцитов (в 0,9 % растворе натрия хлорида), инкубируют 30-40 мин при температуре от 20 до 25 $^\circ\text{C}$ и учитывают результаты.

Материал считают прошедшим испытание, если в течение срока наблюдения не менее 80 % инокулированных эмбрионов остаются живыми и ни в одной пробе аллантоисной жидкости не выявлено гемагглютинирующих агентов.

Второй группе куриных эмбрионов 5-6 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл в желточный мешок. Эмбрионы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 10-12 сут. Материал считается прошедшим испытание, если к концу указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов, а в мазках ткани желточных мешков, окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимзе, не выявляются элементарных телец.

Третьей группе куриных эмбрионов 10-11 дневного возраста материал вводят по 0,2 мл на хорионаллантоисную оболочку, после чего их инкубируют при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 6-7 сут. По истечении указанного срока оболочки извлекают и просматривают в проходящем свете на черном фоне на наличие патологических изменений. Материал считается

прошедшим испытание, если к концу указанного срока инкубации остаются живыми не менее 80% инокулированных эмбрионов и на хорионаллантоисных оболочках всех эмбрионов отсутствуют изменения, видимые невооруженным глазом.

4. Испытание на присутствие микоплазм

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Контролю подлежат: культуральная жидкость контрольных клеточных культур, объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и полуфабриката вакцины до добавления вспомогательных веществ, живых и инаktivированных вирусных вакцин.

При наличии роста микоплазм хотя бы в одной пробирке материал бракуют.

5. Испытание на присутствие микобактерий туберкулеза

Испытание на присутствие микобактерий туберкулеза проводят высевом на питательные среды или методом ПЦР в соответствии с инструкцией по применению после валидации методики.

Если субстратом производства вакцины является культура клеток птиц, испытание на отсутствие микобактерий должно проводиться бактериологически на адекватной питательной среде.

Испытанию подлежат сливы с контрольных (не зараженных вирусом) флаконов с культурой клеток. Исследование проводят путем посева культуральной жидкости на среду Левенштейна-Йенсена. Перед посевом 20 мл исследуемого материала центрифугируют (при необходимости) в течение 15 мин при 4000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и высевают по 0,2 мл в 5 пробирок со скошенной средой Левенштейна-Йенсена. Учёт производят через 45 сут инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Колонии микобактерий должны отсутствовать.

Методы выявления контаминирующих агентов в ИЛП должны быть наиболее современными и информативными, применяться с учетом сложности технологического процесса приготовления этих препаратов и в соответствии с требованиями, изложенными в нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Определение содержания
анатоксинов/токсинов
в реакции флоркуляции**

ОФС.1.7.2.0007.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на реакцию флоркуляции, которая предназначена для определения содержания анатоксинов или токсинов в растворах.

Реакция флоркуляции по Рамону (Ramon assay) основана на способности некоторых антигенов при соединении со специфическими антителами образовывать нерастворимый комплекс «антиген–антитело», который визуальнo выявляется в виде помутнения среды и образования хлопьев (флоркулята). Характерной особенностью реакции флоркуляции является феномен инициальной флоркуляции, т.е. способность формирования флоркулята в первую очередь в тех растворах, где содержание антигена и антител (токсина/анатоксина-антитоксина) эквивалентны.

Для проведения испытания используют специфический антитоксин, калиброванный, в зависимости от использованного иммунохимического метода, в Международных единицах (МЕ) или Lf-эквивалентах (Lf-eq.). Предпочтительнее использовать антитоксины, калиброванные в единицах Lf-eq. против соответствующих международных референс-препаратов анатоксинов для флоркуляционных тестов. За 1 Lf принимают количество анатоксина, которое вступает в реакцию флоркуляции с 1 МЕ или 1 Lf-eq. антитоксина в наиболее короткий промежуток времени. Содержание токсина/анатоксина в растворе, определенное в реакции флоркуляции, выражают в Lf/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

Специфический антитоксин в концентрации 100 МЕ или Lf-eq. в 1 мл вносят в возрастающих объемах (количествах МЕ/мл) в ряд пробирок, содержащих равные объемы испытуемого раствора токсина/анатоксина. Содержимое каждой пробирки доводят до равного объема 0,9 % раствором натрия хлорида. Смеси перемешивают, избегая образования пены. Пробирки со смесями инкубируют на водяной бане при температуре 45–50 °С, периодически оценивая состояние растворов.

Результат реакции оценивают в проходящем свете, при необходимости применяют лупу. Отмечают пробирки, в которых раньше других произошла флуккуляция, и время наступления флуккуляции (Kf). Пробирка, в которой раньше других наблюдается появление хлопьев (инициальная флуккуляция), содержит эквивалентные или близкие к эквивалентным количества антигена и антител. Для расчета содержания антигена учитывают концентрацию антитоксина в этой пробирке. Если инициальная флуккуляция наблюдается одновременно в 2 пробирках, для расчета берут среднее значение показателей концентрации антитоксина, содержащегося в этих пробирках. Если перед проведением реакции флуккуляции испытуемый раствор был разведен, то для расчета содержания анатоксина в растворе полученный результат умножают на степень разведения.

Показатель (Kf) является полезным индикатором качества антигена. Если при данных значениях температуры и концентраций анатоксина и антитоксина значение Kf при повторных испытаниях увеличивается по сравнению с наблюдавшимся ранее, это может свидетельствовать о разрушении антигена и снижении его иммуногенной активности.

Определение содержания анатоксина в испытуемом образце представлено в табл.

Таблица – Определение содержания анатоксина в испытуемом образце

Испытуемый раствор	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
Объем раствора испытуемого анатоксина, мл	1	1	1	1	1
Объем внесенного раствора соответствующего антитоксина, мл	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55
Активность внесенного антитоксина, МЕ/мл	35	40	45	50	55
Объем внесенного 0,9 % раствора натрия хлорида, мл	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45

В данном примере раньше других наблюдалась флоккуляция в пробирке № 3, следовательно, в этой пробирке содержание анатоксина близко или эквивалентно количеству внесенного антитоксина. В данном случае – 45 Лф/мл. Если испытуемый раствор был разведен в 10 раз, содержание анатоксина в нем равно 450 (45·10) Лф/мл. Если инициальная флоккуляция произошла в пробирке № 1 или № 5, результаты не учитывают, а тест повторяют, изменив количество вносимого антитоксина или разведение испытуемого раствора токсина/анатоксина. Для выполнения повторной реакции объемы вносимого в пробирки антитоксина следует выбирать с учетом того, чтобы крайняя пробирка (№ 1 или № 5), в которой наблюдалась инициальная флоккуляция, оказалась в середине ряда.

Для получения более точных результатов повторяют тест, выполняя реакцию флоккуляции с объемами вносимого антитоксина, близкими по значению к эквивалентной концентрации, используя меньшие различия во вносимых объемах. Например: если инициальная флоккуляция произошла в пробирке № 3, следует для уточнения эквивалентной концентрации повторить реакцию, внося в пробирки ряда антитоксин в объемах 0,41; 0,43; 0,45; 0,47; 0,49 мл.

Для подтверждения полученных результатов тест повторяют при тех же условиях. Результаты считаются приемлемыми, если в повторных тестах наблюдаются различия не более чем на 1 разведение антитоксина. За окончательное значение принимают среднее арифметическое повторных измерений.

Реакция флोकюляции для растворов с низкой концентрацией анатоксинов/токсинов

Для растворов анатоксинов или токсинов с низкой концентрацией (менее 5 Lf/мл) предпочтительнее использовать метод смешанной флोकюляции, поскольку Lf смеси анатоксинов равен сумме их Lf (при условии их гомогенности). Метод заключается в сравнении значений Lf раствора анатоксина с предварительно установленной концентрацией с Lf этого же анатоксина в смеси с испытуемым анатоксином низкой концентрации.

Если токсины/анатоксины не гомогенны, может возникать ложная картина с 2 флोकюляционными максимумами. Например: анатоксин с известным содержанием разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1. Тот же анатоксин смешивают с раствором испытуемого анатоксина низкой концентрации в равных соотношениях. Каждую из смесей разливают по 1 мл в ряд пробирок. В пробирки обоих рядов вносят в возрастающих объемах антитоксин с концентрацией 100 ME/мл и 0,9 % раствор натрия хлорида для доведения общего объема в каждой из пробирок до постоянной величины. Инкубируют пробирки на водяной бане при температуре 45 – 50 °C, периодически оценивая состояние раствора. Отмечают пробирки с инициальной флोकюляцией в каждом ряду. Разница значений показателей инициальной флोकюляции обоих рядов указывает на содержание анатоксина в испытуемом растворе.

**Определение концентрации
микробных клеток**

**ОФС.1.7.2.0008.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на микробиологические исследования, при которых необходимо использование взвесей микроорганизмов, содержащих определенное количество микробных клеток.

Концентрация микробных клеток выражается числом клеток определяемых микроорганизмов (включая нежизнеспособные и поврежденные) на единицу объема суспензии. При определении концентрации микробных клеток устанавливается процентное содержание жизнеспособных клеток, определяемое числом живых клеток на единицу объема суспензии (число колониеобразующих единиц в мл – КОЕ/мл).

Процедура подсчета концентрации микробных клеток в лабораторных условиях может выполняться вручную или с помощью автоматических устройств. Различают методы прямого визуального подсчета, определение количества колоний после посева микроорганизмов на питательные среды, а также учет микробных клеток под микроскопом после их окрашивания определенными красителями. Кроме того, могут применяться коммерческие водорастворимые системы, содержащие стандартизованное количество микробных клеток. Современные коммерческие системы просты в использовании и позволяют снизить случайную погрешность при определении концентрации микробных клеток, связанную с человеческим фактором.

Методы прямого подсчета

Методы прямого подсчета дают возможность наиболее полно учесть численность микроорганизмов. Их эффективность гораздо выше, чем метода посева на питательные среды, так как многие микроорганизмы требовательны к условиям культивирования и качеству питательной среды. Кроме того, методы прямого подсчета дают возможность получить дополнительную информацию о размерах и морфологии исследуемых клеток.

Подсчет в счетной камере

Наиболее распространенным методом определения общего числа клеток в 1 мл суспензии является их подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры. Существует несколько видов счетных камер, принципиальное устройство которых одинаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяева, камера подсчета с сеткой Нейбауэра.

Счетная камера Горяева представляет собой специальное предметное стекло с нанесенными на него поперечными прорезями, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной прорезью разделена еще на две площадки, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку с квадратами определенной площади. По обе стороны средней площадки в камере Горяева расположены две других на 0,1 мм выше средней. Плоскости этих площадок служат для притирания покровного стекла до появления так называемых Ньютоновских колец.

После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других имеющая капиллярные пространства, через которые с помощью пастеровской пипетки камеру заполняют разведением взвеси микроорганизма (рис.1).



Рисунок 1 – Счетная камера Горяева

Подсчет клеток проводят под микроскопом, который настраивают таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки микроорганизма, равномерно распределенные на ней. Считают число клеток в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, после чего определяют число клеток (x) в 1 мл исследуемой взвеси по формуле:

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b,$$

где: a – число клеток в 20 квадратах;

$N = 225$ – число больших квадратов в камере Горяева;

$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$ – коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева ($v = 0,9 \text{ мм}^3 = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ мл}$);

b – разведение исходной взвеси микроорганизма.

При подсчете с использованием камеры Горяева необходимо соблюдать следующие основные правила:

- использовать только стандартные покрывные стекла;
- проводить подсчет только чистых культур;
- избегать недостаточного заполнения и переполнения камеры;
- избегать наличия пузырьков воздуха в камере;
- учитывать все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата;

- подсчет клеток производить с объективом 8× (10×), реже 40×. С иммерсионным объективом работать нельзя.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах

Этот метод рекомендуется использовать для определения количества микроорганизмов во взвешях с низкой концентрацией клеток.

Определенный объем исследуемой суспензии фильтруют через мембранный фильтр с нанесенной сеткой. Размер пор фильтра 0,22 или 0,45 мкм. Затем микроорганизмы на фильтре окрашивают карболовым эритрозином и подсчитывают в 20 полях зрения с помощью микроскопа, оснащенного окулярным микрометром. Расчет общего количества микроорганизмов (x) в 1 мл производят по формуле:

$$x = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{s \cdot V},$$

где: S – фильтрующая площадь (мм^2);

10^6 – переводной коэффициент квадратных миллиметров в квадратные микрометры;

N – среднее количество бактерий в одном квадрате;

s – площадь квадрата окулярного микрометра, мкм^2 ;

V – объем профильтрованной жидкости, мл.

При подсчете клеток на мембранных фильтрах с помощью люминесцентного микроскопа используют нелюминесцирующие фильтры. После концентрирования клеток на их поверхности проводят флюорохромирование акридиновым оранжевым и подсчитывают. Этот метод позволяет подсчитать общее количество микроорганизмов и определить среди них количество жизнеспособных клеток, так как при окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные клетки имеют зеленую, а нежизнеспособные – красную окраску.

Методы непрямого определения концентрации клеток микроорганизмов

К непрямым методам определения концентрации клеток

микроорганизмов относятся визуальные методы, методы, основанные на светопоглощении (турбидиметрия), светорассеянии (нефелометрия), электропроводности микробных взвесей (кондуктометрия) и др.

Рост микроорганизмов в питательной среде обычно приводит к изменению ее мутности. Мутность – это способность оптически неоднородной среды рассеивать проходящий свет. Мутность взвесей микроорганизмов является оптическим эквивалентом концентрации содержащихся в них микробных клеток. Мутность зависит как от свойств микроорганизмов (размер, показатель преломления), так и от их количества в единице объема. Мутность микробных взвесей определяют путем сравнения со стандартными образцами мутности.

Турбидиметрия и нефелометрия

Мутность микробной взвеси может быть определена путем измерения оптической плотности при определенной длине волны.

Интенсивность пучка света, проходящего через пробу, уменьшается за счет рассеивания (нефелометрия) или поглощения света (турбидиметрия). Светорассеяние и светопоглощение зависят не только от количества клеток в суспензии, но также от их размеров и формы.

Для более концентрированных взвесей обычно применяют турбидиметрический метод. Для очень разбавленных суспензий используют метод нефелометрии вследствие его большей чувствительности. Действие нефелометра основано на сравнении интенсивности света, рассеянного испытуемой средой, с интенсивностью рассеяния эталона.

При испытании пробу ярко освещают, а затем измеряют интенсивность прошедшего излучения или излучения, рассеянного под определенным углом. Для определения количества клеток в среде используют калибровочный график, отображающий зависимость между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема взвеси. Для построения калибровочного графика измеряют величину светорассеяния в ряде проб с известным содержанием клеток. Калибровочные графики индивидуальны для

каждого микроорганизма.

Для измерения оптической плотности взвесей микроорганизмов возможно использование автоматических систем-анализаторов.

Визуальный метод

Для определения концентрации микроорганизмов может быть использован метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности.

Визуальные методы оптической стандартизации микробных взвесей основаны на принципе установления равенства показателей мутности двух сред – исследуемой взвеси и стандартного образца мутности. Для этого исследуемую взвесь и стандартный образец сравнивают между собой в проходящем или отраженном свете с помощью специальной сравнительной таблицы. Если при одинаковом освещении видимость просвечивающихся через пробирки с исследуемой взвесью и стандартным образцом линий элементов сравнительной таблицы одинакова, то считают, что мутность исследуемой взвеси равна мутности стандартного образца. Зная показатель мутности стандартного образца и его числовой микробный эквивалент, рассчитывают концентрацию микробных клеток в исследуемой взвеси.

Международный стандартный образец мутности Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)

Международный стандартный образец мутности ВОЗ (International Reference Preparation of Opacity (IRP), World Health Organization), равный 10 ME мутности (международным единицам мутности) – это утвержденный ВОЗ первичный эталон мутности для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом, который выпускается под эгидой ВОЗ (International Laboratory for Biological Standard, National Institute for Biological Standards and Control, London, England).

Стандартный образец мутности

Стандартные образцы мутности (СО мутности), равные 10 ME, 5 ME и 20 ME мутности соответственно, предназначены для стандартизации

бактериальных взвесей визуальным методом и обеспечения единства определения концентрации микробных клеток в бактериальных взвешах при микробиологических исследованиях. СО мутности аттестованы с использованием 5-го Международного стандартного образца мутности ВОЗ (№76/522), одна международная единица которого соответствует мутности взвеси коклюшных бактерий, содержащей $1,1 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл.

Мутность экземпляра СО, равная 10 МЕ, ориентировочно соответствует следующим концентрациям других микробных клеток в 1 мл (коэффициент k):

- $11 \cdot 10^9$ клеток/мл для бактерий коклюшной группы;
- $0,93 \cdot 10^9$ клеток/мл для бактерий кишечной группы;
- $1,7 \cdot 10^9$ клеток/мл для бруцеллезных бактерий;
- $2,2 \cdot 10^9$ клеток/мл для холерного вибриона;
- $5,0 \cdot 10^9$ клеток/мл для туляремиальных бактерий (франциселл).

Для экземпляра СО 5 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза меньше, чем для СО 10 МЕ.

Для экземпляра СО 20 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза больше, чем для СО 10 МЕ.

В случае, если исследуемый микроорганизм не указан в тексте выше, допускается использование значения концентрации для микроба, наиболее близкого по размеру к исследуемому.

Определение общей концентрации (ОК) микробных клеток с использованием СО мутности. Исходную взвесь микроорганизмов разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до тех пор, пока ее мутность не будет равна мутности стандартного образца, что определяют в соответствии с инструкцией по применению СО мутности по специальной сравнительной таблице.

Исследуемую микробную взвесь перемешивают встряхиванием или пипетированием в стерильной емкости до гомогенного состояния и переносят в пробирку, входящую в комплект с СО мутности, в объеме 6-7 мл,

что соответствует объему жидкости в пробирке с СО. Для проведения испытания с использованием СО работают только с пробирками, поставляемыми в комплекте с СО мутности.

Перед началом измерения стандартный образец встряхивают в течение 10–15 секунд до полного исчезновения осадка. Если после встряхивания в пробирке с СО мутности остается видимый глазом осадок, экземпляр изымают из обращения.

Совмещают пробирки с СО мутности и исследуемой взвесью микроорганизмов в вертикальном положении на уровне глаз, плотно прикладывают пробирки к сравнительной таблице и освещают источником рассеянного света таким образом, чтобы пробирки не экранировали друг друга от источника света. Источником света могут служить: люминесцентная лампа мощностью от 20 до 40 Вт, лампа накаливания матовая или с матовым фильтром (плафоном) мощностью от 40 до 60 Вт, рассеянный дневной свет. Проводить испытания при прямом солнечном свете не допускается. В случае одинаковой четкости просматриваемых элементов сравнительной таблицы через пробирку с СО и пробирку с исследуемой микробной взвесью, мутность их считают одинаковой и равной мутности, указанной на этикетке СО.

Погрешность визуального определения мутности с помощью СО мутности составляет около 10 %.

Не допускается оставлять экземпляры СО мутности под действием бактерицидного облучателя, а также замораживание.

Расчет ОК микробных клеток проводят по формуле:

$$OK = \frac{V_0 + V_i}{V_0} \cdot k,$$

где: V_0 – объем исходной взвеси, мл;

V_i – объем стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для разведения исходной взвеси, мл;

k – коэффициент: концентрация исследуемых микробных клеток в мл, соответствующая 10 МЕ, КОЕ/мл.

Пример определения общей концентрации (ОК) микробных клеток в вакцине
туляремийной живой сухой

Определение проводят, используя не менее чем три образца.

К 0,5 мл ресуспендированной вакцины ($V_0 = 0,5$ мл) прибавляют порциями стерильный 0,9% раствор натрия хлорида для доведения исследуемой взвеси до мутности, соответствующей 10 МЕ ($V_i = 1,0+0,2+0,3 = 1,5$ мл). Концентрация туляремийных бактерий во взвеси (коэффициент k), соответствующей 10 МЕ, составляет $5,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

$$OK = \frac{0,5 + 1,5}{0,5} \cdot 5,0 \cdot 10^9 = 2,0 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ/мл}$$

Итоговое значение общей концентрации микробных клеток рассчитывают как среднее арифметическое значений ОК по трем образцам.

Стандарт мутности Мак-Фарланда (McFarland)

Другим примером стандартизации по стандарту мутности микробной взвеси является использование стандарта Мак-Фарланда (McF). Согласно инструкции по применению, изготавливают 1 % растворы бария хлорида и серной кислоты. Для приготовления стандарта мутности и взвеси микроорганизмов, подлежащей исследованию, подбирают пробирки одного диаметра. В пробирки изготавливаемого стандарта разливают 1 % раствор серной кислоты в объеме, указанном в табл. 1 и добавляют 1 % раствор бария хлорида для получения общего объема 10 мл. Пробирки с изготовленным стандартом герметично закрывают. Жидкость в стандарте Мак-Фарланда и исследуемой пробирке должна быть гомогенно мутной.

Внимание! Бария хлорид и серная кислота – ядовитые вещества.

Количественную характеристику исследуемой микробной взвеси определяют сравнением с ближайшими по мутности пробирками тем же способом, как при использовании СО мутности с учетом данных, приведенных в табл. 1. Методика не предназначена для определения общей концентрации микробных клеток в бактериальных взвесьях при производстве и контроле иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Таблица 1 - Количественная оценка бактериальных взвесей по шкале Мак-Фарланда

Номер по шкале Мак-Фарланда	Объем, мл		Приблизительное количество КОЕ/мл	Соответствующая микробная взвесь, КОЕ/мл
	1% H ₂ SO ₄	1% BaCl ₂		
0,5	9,95	0,05	1·10 ⁸	1,5·10 ⁸
1	9,9	0,1	3·10 ⁸	3·10 ⁸
2	9,8	0,2	6·10 ⁸	6·10 ⁸
3	9,7	0,3	9·10 ⁸	9·10 ⁸
4	9,6	0,4	12·10 ⁸	12·10 ⁸
5	9,5	0,5	15·10 ⁸	15·10 ⁸
6	9,4	0,6	18·10 ⁸	18·10 ⁸
7	9,3	0,7	21·10 ⁸	21·10 ⁸
8	9,2	0,8	24·10 ⁸	24·10 ⁸
9	9,1	0,9	27·10 ⁸	27·10 ⁸
10	9,0	1,0	30·10 ⁸	30·10 ⁸

Кондуктометрические методы

Кондуктометрические методы основаны на зависимости сопротивления или проводимости среды от концентрации клеток. При росте и размножении в соответствующей жидкой питательной среде микроорганизмы продуцируют высокозаряженные ионные метаболиты, что приводит к изменению электрохимических свойств питательной среды. Эти изменения полного сопротивления, измеряемые проводимостью или емкостным сопротивлением, регистрируются электродами, находящимися в контакте с культуральной средой. Время определения обратно пропорционально концентрации микробных клеток в суспензии. Для дрожжевых и плесневых грибов, которые вызывают только незначительные изменения электропроводности, обычно применяют косвенные методы измерения

проводимости с использованием источника калия гидроксида, однако прямые измерения также могут быть применены.

Одним из таких методов является подсчет числа клеток в электронном счетчике Култера. Суспендированные в электролите клетки проходят через апертуру малого диаметра, расположенную между двумя электродами. Когда клетки проходят через апертуру («электрочувствительную зону»), каждая из них вытесняет определенное количество электролита, вызывая возрастание сопротивления. В результате происходит небольшое изменение величины электрического тока в усилителе, который преобразует колебания силы тока в импульсы напряжения, которые находятся в прямой зависимости от размера прошедшей через апертуру клетки.

К преимуществам данного метода относится возможность подсчета общего количества клеток и распределения клеток популяции по размерам.

Методы определения жизнеспособных клеток микроорганизмов

Метод мембранной фильтрации

С помощью мембранной фильтрации может быть определено как общее количество клеток, так и количество жизнеспособных микроорганизмов. В последнем случае после проведения фильтрации мембранный фильтр помещают на соответствующую плотную питательную среду. После инкубации в адекватных для исследуемого микроорганизма условиях подсчитывают видимые колонии. Метод мембранной фильтрации аналогичен методу подсчета клеток на чашках, но является более чувствительным, поскольку через фильтр можно пропускать большие объемы исследуемого материала.

Метод посева на питательные среды (чашечный метод)

Сущность метода заключается в посеве определенного объема из серии десятикратных разведений суспензии исследуемых микроорганизмов на плотную питательную среду, инкубации и подсчете образовавшихся колоний, учитывая, что каждая колония – результат размножения одной жизнеспособной клетки микроорганизма.

Посев осуществляют одним из чашечных методов, указанных в разделе «Микробиологическая чистота», а именно: глубинным, поверхностным, двуслойным или модифицированным агаровым методом. При этом из каждого разведения производят посев на набор чашек с плотной питательной средой (так называемый, метод параллельных высево́в).

При учете результатов определяют среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний бактерий находится в пределах от 30 до 300, а колоний грибов – от 10 до 100.

Если чашки из двух последовательных разведений попадают в эту область, количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл рассчитывают как их среднее значение.

Рассчитывают среднее количество КОЕ (N) в 1 мл по формуле:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

где: c – сумма подсчитанных колоний на всех чашках;

n_1 – количество чашек первого разведения;

n_2 – количество чашек второго разведения;

d – коэффициент первого разведения;

0,1 – коэффициент, учитывающий кратность первого и второго разведения.

Пример: В двух последовательных разведениях 10^{-6} и 10^{-7} были получены результаты: 168; 215 и 14; 25 колоний соответственно.

Количество микроорганизмов в исходной суспензии равно:

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}} = 1,9 \cdot 10^8 \text{ КОЕ/мл.}$$

Окраска селективными красителями

Данное исследование основано на витальном (или прижизненном) окрашивании микроорганизмов, что позволяет различать живые и погибшие

клетки (живые клетки не окрашиваются, мертвые или поврежденные клетки окрашиваются). Наиболее часто используемые красители – трипановый синий, эритрозин В или нигрозин. Оптимальное значение pH 7,5. Концентрация красителя и время окрашивания валидируются.

Окрашивание клеточной суспензии, например раствором трипанового синего проводят, осторожно смешивая краситель с суспензией микробных клеток. Выдерживают в течение 2 мин. при комнатной температуре. Далее перемешивают и помещают в счетную камеру. Подсчет проводят незамедлительно. Необходимо, чтобы время контакта клеток с красителем при окрашивании составляло не более 4 мин., так как увеличение времени экспозиции с красителем значительно увеличивает количество окрашенных клеток.

Процентное содержание жизнеспособных клеток (X) определяют как отношение числа неокрашенных (живых) клеток к общему числу клеток под оптическим микроскопом. При этом учитывают как все неокрашенные (живые), так и все окрашенные (мертвые) клетки. Жизнеспособность (X) в процентах (%) определяется по формуле:

$$X = \frac{n}{N} \cdot 100;$$

где: n – число неокрашенных жизнеспособных клеток,

N – общее число клеток.

**Определение специфической
активности пробиотиков**

**ОФС.1.7.2.0009.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы испытания специфической активности пробиотических производственных штаммов и пробиотиков на их основе, которая определяется количеством жизнеспособных бактерий и активностью кислотообразования или их антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам.

Таким образом, описанные в настоящей статье микробиологические методы позволяют определить следующие показатели специфической активности испытуемого препарата или штамма:

- количество жизнеспособных бактерий в 1 дозе¹ иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП) (раздел 1);
- активность кислотообразования (раздел 2);
- антагонистическая активность (раздел 3).

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Требования к специфической активности испытуемого препарата касаются определения количества живых бактерий в 1 дозе лекарственного средства, кислотообразующей активности штаммов-продуцентов, входящих в лакто- и бифидосодержащие пробиотики для медицинского применения, и определения уровня антагонистической активности испытуемого препарата.

Контроль испытуемого препарата по показателю «Количество жизнеспособных бактерий в одной дозе лекарственного средства» является обязательным при отработке новых технологий производства лекарственного

средства, предварительном и сертификационном контроле, оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности. Определение количества живых микроорганизмов в испытуемой дозе проводят методом серийных разведений, при необходимости, с последующим высевом на питательные среды (Человеческая доза – доза испытуемого препарата, указанная на этикетке или в инструкции по медицинскому применению (листке-вкладыше)).

. При проведении контроля поликомпонентных или комбинированных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех видов или штаммов, входящих в состав препарата.

Показатель «Активность кислотообразования» является обязательным при контроле штаммов-продуцентов, входящих в состав лакто- и бифидосодержащих пробиотиков, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности.

Показатель «Антагонистическая активность» является обязательным при контроле колисодержащих и споровых пробиотиков для медицинского применения и производственных штаммов. Уровень антагонистической активности ИЛП в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов.

Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

Питательные среды, используемые в испытаниях

Для выращивания микроорганизмов, входящих в пробиотики для медицинского применения, используют адекватную для данного вида бактерий и для данной методики питательную среду (если нет других указаний в нормативной документации):

- для лактобактерий – МРС- 2, МРС- 4, МРС- 5, МРС- 1; для ацидофильных лактобактерий – стерильное обезжиренное молоко;

- для бифидобактерий – полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка, среду Блаурокка с натрия азидом, МРС-5;
- для кишечной палочки – среду Эндо, мясопептонный агар (МПА), среду Гаузе № 2 агаризованную;
- для энтерококков – МПА, среду № 1;
- для бактерии рода *Bacillus* – среду Гаузе № 2 агаризованную, МПА, полусинтетическую среду с дрожжевым диализатом.

Питательные среды для проведения испытаний готовят в соответствии с приведенными ниже указаниями. Также могут использоваться эквивалентные коммерчески доступные среды при условии, что они выдерживают испытания на ростовые свойства. Необходимое значение pH питательных сред устанавливают при температуре $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Среда МРС-1

В 200 мл воды очищенной последовательно растворяют:

- | | |
|---|----------|
| • марганец сернокислый | 0,05 г |
| • цистеин солянокислый или L-цистин | 0,10 г |
| • магний сернокислый | 0,200 г |
| • калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный | 2,00 г |
| • аммония цитрат | 2,00 г |
| • натрия ацетат (натрий уксуснокислый) | 5,00 г |
| • печеночный экстракт ^{а)} (1:1) | 100,0 мл |
| • дрожжевой аутолизат ^{б)} с содержанием | |
| • аминного азота $(0,15 \pm 0,03) \%$ | 50,0 мл |
| • пептон сухой ферментативный | 10,00 г |
| • гидролизат обезжиренного молока ^{в)} | 500,0 мл |
| • полисорбат 80 | 1,00 мл |
| • глюкоза | 20,00 г |

Доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл; pH среды $(6,4 \pm 0,2)$. Питательную среду разливают в пробирки по 10 , 25 или 30 мл и

стерилизуют при температуре $(120 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения готовой стерильной среды 2 мес при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ или не более 1 мес при температуре от 18 до $25 ^\circ\text{C}$.

Примечание.

^{а)} Приготовление печеночного экстракта с содержанием аминного азота $(0,050 \pm 0,005) \%$.

- Печень говяжья 1,0 кг
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется).

Приготовление: 1,0 кг свежей говяжьей печени очищают от жира, пленок и протоков, нарезают кубиками размером $(3 \times 3 \times 3)$ см, заливают 1 л воды очищенной и кипятят в течение 1,5 – 2 ч. Остывший отвар фильтруют через марлевый фильтр (ткань «миткаль»), количество отвара доводят водой очищенной до 1 л, разливают в бутылки и стерилизуют при температуре $120 \pm 2 ^\circ\text{C}$ в течение 15 ± 1 мин. Срок хранения печеночного экстракта при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ не более 6 мес или не более 3 мес при комнатной температуре.

^{б)} Приготовление дрожжевого аутолизата с содержанием аминного азота $(0,15 \pm 0,03) \%$.

- Дрожжи хлебопекарные 1000 г
- Вода питьевая 4000 мл
- Хлороформ 40 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин.

^{в)} Приготовление гидролизата обезжиренного молока по Богданову.

- Молоко коровье пастеризованное, нежирное ($\text{pH } 6,7 \pm 0,1$) 1000 мл
- Панкреатин 1,0 г
- Хлороформ 5,0 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин.

Среда МРС-2

- Марганец сернокислый 0,05 г
- Цистеин солянокислый или L-цистин 0,10 г
- Магний сернокислый 0,20 г
- Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 2,00 г
- Аммония цитрат 2,00 г

• Натрия ацетат	5,00 г
• Печеночный экстракт (1:1)	100,0 мл
• Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота ($0,15 \pm 0,03$) %	50,0 мл
• Пептон сухой ферментативный	10,00 г
• Гидролизат обезжиренного молока	500,0 мл
• Полисорбат 80	1,00 мл
• Глюкоза	20,00 г
• Агар микробиологический	1,00 г
• Вода очищенная	до 1000 мл

Значение pH готовой среды ($6,4 \pm 0,2$). Питательную среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре (120 ± 2) °C в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 °C или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °C.

Среда МРС-4

В 200 мл воды очищенной последовательно растворяют:

• Марганец сернокислый	0,05 г
• Цистеин солянокислый или L-цистин	0,10 г
• Магний сернокислый	0,200 г
• Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный	2,00 г
• Аммония цитрат	2,00 г
• Натрия ацетат	5,00 г
• Печеночный экстракт (1:1)	100,0 мл
• Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота ($0,15 \pm 0,03$) %	50,0 мл
• Пептон сухой ферментативный	10,00 г
• Гидролизат обезжиренного молока	500,0 мл
• Полисорбат 80	1,00 мл
• Глюкоза	20,00 г

- Агар микробиологический 19,0 г

Доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл (рН 6,4±0,2). Питательную среду стерилизуют в автоклаве при температуре (120 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С в стерильных герметичных флаконах или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Среда МРС-5

- Марганец сернокислый 0,05 г
- Цистеин солянокислый или L-цистин 0,10 г
- Магний сернокислый 0,200 г
- Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 2,00 г
- Печеночный экстракт (1:1) 100,0 мл
- Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15±0,03) % 50,0 мл
- Пептон сухой ферментативный 10,00 г
- Гидролизат обезжиренного молока 500,0 мл
- Полисорбат 80 1,00 мл
- Глюкоза 20,00 г
- Агар микробиологический 15,0 г
- Вода очищенная до 1000 мл.

Питательную среду (рН 7,0) стерилизуют в автоклаве при температуре (120±2) °С в течение (15±1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С в стерильных герметичных контейнерах (флаконах) или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Примечание.

Приготовление обезжиренного стерильного молока рН (6,7±0,3); показатель кислотности не более 18 °Т:

- Молоко сухое обезжиренное 80 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Разливают в пробирки по 10 , 25 или 30 мл и стерилизуют при температуре (120±2) °С в течение (15±1) мин (процесс стерилизации

валидируется). Срок хранения обезжиренного стерильного молока 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Модифицированная печеночная среда Блаурокка

- Печеночная вода (1:2) с содержанием аминного азота (100 ± 20) мг% 1000 мл
- Пептон сухой 10 г
- Натрия хлорид 5 г
- Лактоза 10 г
- Цистеин 0,1 г
- Агар микробиологический 0,75 г

Устанавливают требуемое значение pH (7,2 ± 0,2) с помощью 20 % раствора натрия гидроксида. Питательные среды разливают в пробирки по 10, 25 или 30 мл и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (60 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется). Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С. После 14 сут хранения перед использованием для снижения содержания растворенного кислорода среду следует однократно регенерировать путем нагревания пробирок на водяной бане при температуре 70 – 80 °С в течение 10 – 15 мин.

Примечание.

Приготовление печеночной воды с содержанием аминного азота (100±20) мг %.

- Печень говяжья 0,5 кг
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется).

0,5 кг свежей говяжьей печени очищают от жира, пленок и протоков, нарезают кубиками размером (3×3×3) см, заливают 1 л воды очищенной и кипятят в течение 1,5 – 2 ч. Остывший отвар фильтруют через марлевый фильтр (ткань «миткаль»), количество отвара доводят водой очищенной до 1 л, разливают в бутылки и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения – не более 6 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Среда Блаурокка с азидом натрия

- Среда Блаурокка 1000 мл
- Натрия азид 0,1 г

Среду перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре $(112 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 1 мес при температуре от 2 до 8°C .

Среда Гаузе №2 агаризованная

- Бульон Хоттингера¹⁾ с содержанием аминного азота 700 мг% 30 мл
- Пептон сухой 5 г
- Натрия хлорид 5 г
- Глюкоза 10 г
- Агар микробиологический 30 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Примечание.

Приготовление бульона Хоттингера (содержание аминного азота 700 мг%).

- Гидролизат Хоттингера 24,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре $(112 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды в течение 6 мес при температуре от 2 до 8°C в стерильных герметичных контейнерах (флаконах).

Полусинтетическая среда с дрожжевым диализатом агаризованная

- Марганец хлористый 4-водный или марганец сернокислый 0,01 г
- Железо(III) сернокислое 7-водное 0,01 г
- Магний сернокислый 7-водный или магния хлорид 6-водный 0,1 г
- Кальция хлорид 0,08 г
- Пептон сухой 0,5 г
- Дрожжевой диализат с содержанием азота аминного 150 мг % 5,0 мл
- Глюкоза 10,0 г
- Агар микробиологический 20-30 г
- Вода очищенная до 1000 мл.

Стерилизация в автоклаве при температуре $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ в стерильных герметичных контейнерах (флаконах).

Мясопептонный агар (МПА)

- | | |
|---------------------------|------------|
| • Пептон | 10,0 г |
| • Натрия хлорид | 5,0 г |
| • Мясная вода | 300–500 мл |
| • Агар микробиологический | 13–20 г |

В мясную воду вносят 10 г пептона и 5 г натрия хлорида, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Приготовленный бульон фильтруют, устанавливают pH 7,2–7,4 и добавляют измельченный агар в количестве, зависящем от его качества и назначения среды. После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном перемешивании до полного растворения агара. Разливают в пробирки и флаконы, стерилизуют при температуре $120 ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. После стерилизации среда, остывая, уплотняется.

Срок хранения готовой среды (pH $7,3 \pm 0,2$) 6 мес при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ или не более 1 мес при температуре от 18 до $25 ^\circ\text{C}$.

Мясопептонный бульон (МПБ)

- | | |
|-----------------|----------|
| • Пептон | 10,0 г |
| • Натрия хлорид | 5,0 г |
| • Мясная вода | 1000 мл. |

В мясную воду вносят 10 г пептона и 5 г натрия хлорида, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Приготовленный бульон фильтруют, устанавливают pH 7,2–7,4 и разливают в пробирки и флаконы. Стерилизуют при температуре $120 ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ или не более 1 мес при температуре от 18 до $25 ^\circ\text{C}$.

Примечание.

Приготовление мясной воды (1:2).

- Мясо–говядина (фарш) 500 г
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация при температуре 121 °С в течение 20 мин. Срок хранения 2 мес при температуре от 2 до 8 °С и не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Перед испытанием, в случае использования плотной питательной среды, по 10–15 или 20–25 мл расплавленной агаризованной питательной среды (при температуре около 45 °С) разливают в стерильные чашки Петри диаметром 9 или 12 см (соответственно), оставляют на горизонтальной поверхности и дают среде застыть. Поверхность агаризованных сред перед посевом подсушивают для удаления конденсационной воды и проверки стерильности. Чашки Петри с питательными средами помещают закрытыми и перевернутыми вверх дном в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 48 ч. Агар Эндо подсушивают 40 мин в ламинарном шкафу с открытыми крышками.

Раздел 1. Определение количества жизнеспособных бактерий в 1 дозе ИЛП

В настоящем разделе изложены общие принципы определения количества живых бактерий в пробиотиках для медицинского применения методом десятикратных разведений с высевом на плотные питательные среды (метод Коха) и глубинного чашечного метода или в жидкие и полужидкие среды (метод предельных разведений). Результаты количественного определения микроорганизмов выражаются в колониеобразующих единицах (КОЕ).

Отбор и подготовка образцов для анализа

От каждой испытуемой серии препарата пробиотика методом случайной выборки отбирают по 3 испытуемых образца.

Испытания проводят, соблюдая правила асептики.

Каждый образец в отдельности разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

Особенности подготовки испытуемого образца в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):

1. *Лиофилизаты (флаконы)* – каждый образец в отдельности ресуспензируют стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (из расчета 1 мл на 1 дозу) и перемешивают пипеткой 8–10 раз, получая исходное разведение.
2. *Порошки* – содержимое пакета (саше) асептически пересыпают в стерильную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают путем энергичного встряхивания в течение 10 мин, получая разведение 1:100 (10^{-2}).
3. *Таблетки* – каждый образец в отдельности предварительно растирают в стерильной ступке стерильным пестиком до гомогенного состояния и дробно добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз, получая исходное разведение.
4. *Капсулы* – каждый образец в отдельности вносят в стерильные пробирки, добавляют 10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки с капсулами помещают на водяную баню при температуре $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 10–30 мин содержимое пробирок перемешивают до гомогенного состояния, получая разведение 1:10 (10^{-1}).
5. *Суппозитории* – каждый образец в отдельности помещают в стерильные пробирки и добавляют предварительно нагретый до температуры $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида до общего объема 10 мл в зависимости от величины средней массы суппозитория испытуемой серии (например, при массе 1,1 г добавляют 8,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, а при массе 2 г – 8 мл физиологического раствора). Пробирки с суппозиториями помещают на водяную баню при температуре $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 10–30 мин содержимое пробирок

перемешивают до гомогенного состояния, получая разведение 1:10 (10^{-1}).

Методика испытания

Испытание проводят методом последовательных десятикратных разведений, соблюдая правила асептики. Для этого 1 мл микробной суспензии испытуемого образца (исходное разведение, разведения 10^{-1} или 10^{-2}) вносят пипеткой в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем новой пипеткой 10–15 раз перемешивают, получая следующее разведение (10^{-2} или 10^{-3}), и затем 1 мл суспензии переносят в следующее разведение. Титрование проводят до разведений, из которых будет произведен высев на питательные среды. Для каждого разведения используют отдельную пипетку.

В случае, если образец содержит 1 дозу, 0,5 мл микробной суспензии испытуемого образца (исходное разведение) пипеткой вносят в пробирку, содержащую 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем новой пипеткой 10–15 раз перемешивают, получая следующее разведение (10^{-1}) и 1 мл суспензии переносят в пробирку с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение 10^{-2} . Титрование проводят до разведений, из которых будет произведен высев на питательные среды. Для каждого разведения используют отдельную пипетку.

В зависимости от биологических свойств бактерий, входящих в состав испытуемого образца, используют соответствующую методику испытания.

1. Высев на плотные питательные среды

1.1 Метод Коха

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца из 2 последних разведений (степень разведения зависит от количества КОЕ в 1 дозе исследуемого препарата) по 0,1 мл микробной суспензии высевают на чашки Петри с питательной средой (по 2 чашки на каждое разведение). Суспензию равномерно распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского или с помощью стеклянных бус до полного

впитывания (высыхания) суспензии. Чашки закрывают и помещают перевернутыми вверх дном в термостат для инкубации.

Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24–96 ч в адекватных, в зависимости от вида микроорганизма, условиях (аэробных, микроаэрофильных или анаэробных). При инкубировании в анаэробных или микроаэрофильных условиях чашки Петри с посевами помещают в анаэроостат и создают необходимую газовую атмосферу.

Данный метод может быть использован при определении количества живых бактерий каждого вида в поликомпонентных пробиотиках при условии, что бактерии, входящие в состав препарата, образуют визуально различимые по форме и другим признакам колонии.

1.2. Глубинный чашечный метод

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца из 2 последних разведений (степень разведения зависит от количества КОЕ в исследуемом препарате) по 1,0 мл микробной суспензии стерильной пипеткой вместимостью 1,0 мл вносят в чашки Петри диаметром 90 мм (по 2 чашки на каждое разведение). Добавляют 20–25 мл расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5 ^\circ\text{C}$ агаризованной питательной среды, закрывают и быстро осторожно перемешивают вращательно-поступательными движениями, не отрывая дна чашки от поверхности стола и не допуская попадания среды на крышку чашки. После застывания агара чашки Петри переворачивают вверх дном и инкубируют в адекватных условиях при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение необходимого для данного микроорганизма времени.

Учет результатов

По окончании инкубации производят подсчет выросших на чашках Петри колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе испытуемого образца. При подсчете учитывают чашки, на которых выросло не менее 15 колоний.

Пример расчета содержания живых микробных клеток в 1 дозе

испытуемого образца:

– из разведения 10^{-7} выросло 42 и 45 колоний; среднее арифметическое равно $(42+45) : 2 = 43,5$;

– из разведения 10^{-6} выросло 410 и 450 колоний; среднее арифметическое равно $(410+450) : 2 = 430$;

– количество живых бактерий в 1 дозе равно:

$$(43,5 \cdot 10^7 + 430 \cdot 10^6) : 2 \cdot 10 = 4325000000 = 4,3 \cdot 10^9.$$

Умножают среднюю арифметическую числа колоний на степень разведения и в том случае, если высев на чашку Петри сделан в объеме 0,1 мл, умножают на коэффициент 10 для пересчета на 1,0 мл.

2. Метод предельных разведений с последующим высевом на жидкие и полужидкие питательные среды

2.1. Пробирочный метод наиболее вероятных чисел (определение количества живых ацидофильных лактобактерий)

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} (степень разведения зависит от количества КОЕ в испытуемом образце) высевают по 1 мл микробной суспензии от каждого разведения в 2 пробирки с 9 мл стерильного обезжиренного молока. Отмечают, из какого именно разведения сделан посев. Разведение 10^{-6} препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению 10^{-6} в молоке. Для контроля среды добавляют 4 незасеянные пробирки с молоком. Засеянные и контрольные пробирки инкубируют при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 3–4 сут.

По окончании инкубации определяют количество пробирок со свернувшимся молоком. Из сгустка с культурой готовят мазки и окрашивают по Граму. Если в мазках видны характерные бактерии и отсутствует посторонняя микрофлора, то данное разведение учитывают, как содержащее микроорганизмы данного вида. В случае сквашивания молока в контрольных пробирках и при обнаружении посторонней микрофлоры в мазках, контроль проводят на новой партии среды.

Учет результатов

При подсчете количества живых особей используют таблицу Мак-Креди (табл. 1). Сначала составляют числовую характеристику. Она состоит из 3 цифр: на первое место (слева) ставят цифру, равную числу пробирок со свернувшимся молоком, взятых в том последнем разведении, где молоко свернулось во всех пробирках (например, 2 пробирки разведения 10^{-6}).

Следующие две цифры обозначают число пробирок со свернувшимся молоком в 2 последующих разведениях (например, в 1 пробирке разведения 10^{-7} и в 1 пробирке разведения 10^{-8}).

Числовая характеристика результата будет 211.

По таблице Мак-Креди находят вероятное число, соответствующее полученной цифровой характеристике (в нашем случае 13), умножают его на разведение, которому соответствует первая цифра числовой характеристики (в данном примере – 10^{-6}). Тогда количество живых особей микроорганизмов в 1 дозе составляет $13 \cdot 10^6 = 1,3 \cdot 10^7$.

Таблица 1 – Таблица Мак-Креди, используемая при подсчете количества живых ацидофильных лактобактерий

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при посеве в 2 параллельные пробирки
200	2,5
201	5,0
202	-
210	6,0
211	13,0
212	20,0
220	25,0
221	70,0

2.2. Пробирочный метод учета колоний в полужидкой среде

Из разведений препарата $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$ (степень разведения зависит от количества КОЕ в испытуемом образце) высевают по 1 мл микробной суспензии в пробирки, содержащие 9 мл полужидкой

питательной среды. Отмечают, из какого именно разведения сделан посев. Разведение 10^{-6} препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению 10^{-6} в питательной полужидкой среде.

Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в зависимости от вида микроорганизма в течение 1–6 сут. По окончании инкубации отмечают разведения, в которых имеется рост типичных колоний для данного вида микроорганизмов.

Учет результатов

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца в полужидкой питательной среде должно наблюдаться 10-кратное уменьшение количества колоний микроорганизмов.

Количество живых бактерий в дозе испытуемого препарата вычисляют путем умножения количества колоний в пробирке на величину разведения микробной суспензии в данной пробирке (объем вносимого материала в 1,0 мл дает коэффициент умножения 1, который не влияет на конечный результат при вычислении).

3. Определение количества живых бактерий в поликомпонентных пробиотиках

3.1 Комбинированный метод (определение количества бифидо- и колибактерий)

Для определения количества живых бактерий в составе препарата пробиотика из соответствующих последовательных десятикратных разведений испытуемого образца в 0,9 % растворе натрия хлорида (с 10^{-1} по 10^{-9}) проводят высевы на среду Блаурокка с натрия азидом (учет бифидобактерий) и на среду Эндо (учет колибактерий).

Для определения количества бифидобактерий по 1 мл микробной суспензии из разведений 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} высевают в пробирки, содержащие 9 мл полужидкой питательной среды Блаурокка с азидом натрия (отмечая разведение, из которого сделан посев). При этом учитывают, что разведение

10^{-6} препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению 10^{-6} в среде Блаурокка с азидом натрия. Посевы в среде Блаурокка с азидом натрия инкубируют при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 4 – 5 сут.

Для определения количества кишечных палочек делают посев по 0,1 мл микробной суспензии из разведений испытуемого образца 10^{-5} , 10^{-6} на чашки Петри со средой Эндо (по 2 чашки от каждого разведения). Суспензию равномерно распределяют по поверхности среды Эндо шпателем Дригальского до полного впитывания (высыхания) суспензии. Чашки закрывают и помещают перевернутыми вверх дном в термостат для инкубации. Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч.

Учет результатов

В среде Блаурокка с натрия азидом по окончании инкубации отмечают разведения, в которых имеется рост колоний в виде «гвоздиков». Количество живых бактерий в дозе вычисляют путем умножения количества колоний в пробирке на величину разведения микробной суспензии в данной пробирке.

На среде Эндо по окончании инкубации производят подсчет выросших на чашках Петри колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе препарата. При подсчете учитывают чашки, на которых выросло не менее 15 колоний. Пример для расчета аналогичен описанному в подразделе 1.

Раздел 2. Активность кислотообразования

Кислотообразующую активность штаммов-продуцентов, входящих в состав лакто- и бифидосодержащих пробиотиков для медицинского применения определяют по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Испытание количественного определения кислотообразующей активности проводят методом кислотно-основного титрования.

Для выращивания бифидобактерий используют полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка, для лактобактерий – МРС-

1 или стерильное обезжиренное молоко, если нет других указаний в нормативной документации.

Реактивы, используемые в испытании:

- титрованный 0,1 М раствор натрия гидроксида;
- индикатор – 1% раствор фенолфталеин.

Особенности отбора и подготовки образцов для анализа

От каждой испытуемой серии лекарственного средства, независимо от ее объема, методом случайной выборки отбирают по 2 образца. В случае, если испытуемый образец (т.е. таблетка/капсула/суппозиторий) содержит 1 дозу, то в 1 образец объединяют 3 таблетки/капсулы/суппозитория.

Испытания проводят, соблюдая правила асептики.

Особенности подготовки испытуемого образца в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):

1. *Лиофилизаты* – испытуемый образец (каждый образец в отдельности) разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу препарата и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

По 2,5 мл полученной суспензии каждого образца вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 25 мл питательной среды. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).

2. *Таблетки* – каждый образец в отдельности предварительно растирают (асептически) в ступке до гомогенного состояния и дробно добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

По 2,5 мл полученной суспензии каждого образца вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 25 мл питательной среды. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида

микроорганизма).

3. *Порошки* – содержимое саше асептично пересыпают в пробирку, вместимостью 50 мл, содержащую 25 мл питательной среды, и перемешивают. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).
4. *Капсулы* – каждый образец в отдельности вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 30 мл питательной среды адекватной для вида микроорганизма, входящего в состав препарата. Пробирки помещают на водяную баню при температуре $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).
5. *Суппозитории* – каждый образец в отдельности вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 30 мл питательной среды, адекватной для вида микроорганизма, входящего в состав препарата. Пробирки помещают на водяную баню при температуре $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации определяются видом микроорганизма).

Примечание.

После окончания инкубации суспензию в пробирках освобождают от липофильной суппозиторной основы одним из следующих способов:

- сразу после окончания инкубирования при температуре посевов $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ стерильной пипеткой удаляют растопленный верхний слой жира;
- пробирки охлаждают при температуре от 2 до 8°C в течение (20 ± 5) мин, затем застывшую суппозиторную основу снимают асептически пастеркой с загнутым концом или бактериологической петлей.

Методика испытания

Уровень кислотообразования определяют в каждом из 2 образцов. После окончания инкубации содержимое пробирки перемешивают отдельной пипеткой 8–10 раз. Каждую пробу в объеме 10 мл вносят в отдельную коническую колбу или стакан вместимостью 100 мл.

Штаммы-продуценты, выращенные в стерильном обезжиренном молоке, образуют сгусток. Образовавшийся сгусток разбивают путем тщательного перемешивания (10–12 раз) пипеткой вместимостью 10 мл. После этого 10 мл микробной суспензии переносят из пробирки с культуральной средой в коническую колбу вместимостью 100 мл, содержащую 20 мл воды очищенной. Колбу интенсивно встряхивают для равномерного перемешивания содержимого, затем прибавляют 2–3 капли 1% раствора фенолфталеина.

Полученную суспензию титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления стойкого слабо-розового окрашивания и достижения рН ($8,5 \pm 0,1$) (контролируют потенциметрически), при этом учитывают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование.

Учет результатов

Кислотность выражают в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$) и вычисляют по формуле:

$$^{\circ}\text{T} = A \cdot K \cdot 10,$$

где: A – количество миллилитров 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой микробной суспензии;

K – поправка к титру 0,1 М раствора натрия гидроксида;

10 – объем микробной суспензии, мл.

Пример расчета: на титрование 10 мл микробной суспензии пошло 10,6 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, где $K = 1,03$, тогда:

$$\text{T} = 10,6 \cdot 1,03 \cdot 10 = 109,18 \text{ } ^{\circ}\text{T}$$

Вычисляют средний показатель из 2 параллельных проб от каждого

образца (пробирки) и средний показатель из 2 образцов (пробирок) при условии, если показатель активности кислотообразования каждого из них был не ниже регламентированного.

Раздел 3. Антагонистическая активность

Антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивают как у штаммов-продуцентов, так и у препаратов пробиотиков, полученных на их основе. Определение антагонистической активности штаммов-продуцентов, входящих в пробиотики для медицинского применения, проводят с помощью метода отсроченного антагонизма.

При проведении испытания применяют питательную среду, адекватную для данного вида бактерий (если нет других указаний в нормативной документации):

- для лактобактерий и бифидобактерий – среду МРС-5;
- для кишечной палочки и споровых пробиотиков – среду Гаузе № 2.

Тест-штаммы микроорганизмов

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые в испытании, приведены в табл. 2. Их получают в лиофилизированном виде (в ампулах) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» (если нет других указаний в нормативной документации) с сертификатом соответствия (паспортом на штамм).

Таблица 2 – Тест-штаммы микроорганизмов, используемых в испытаниях по отсроченному антагонизму

Тест-штамм микроорганизма	Номер штамма
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (FDA 209P)
<i>Escherichia coli</i>	O157
<i>Shigella flexneri</i>	170, 337
<i>Shigella sonnei</i>	5063
<i>Proteus mirabilis</i>	H-237 или 56/10
<i>Proteus vulgaris</i>	177 или 401

<i>Candida albicans</i>	ATCC10231
-------------------------	-----------

Восстановление лиофилизированных тест-штаммов микроорганизмов

Ампулы с тест-культурами микроорганизмов вскрывают в асептических условиях в соответствии с инструкцией производителя.

Для восстановления жизнеспособности культуры необходимо не менее двух пересевов на адекватной питательной среде (соответствующей потребностям используемого микроорганизма) с инкубацией в стандартных условиях. Для получения изолированных колоний второй пересев культуры тест-штамма проводят на адекватной плотной питательной среде при инкубации в стандартных условиях.

Температура инкубации посевов бактерий ($32,5 \pm 2,5$) °C, грибов – ($22,5 \pm 2,5$) °C, если нет других указаний в нормативной документации.

По окончании инкубации изучают морфологию выросших колоний, микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, изучают биохимические свойства с использованием тест-систем, разрешенных к использованию. Тест-штамм микроорганизма должен обладать типичными морфологическими, тинкториальными, культуральными, биохимическими свойствами в соответствии с представленным сертификатом коллекции.

Тест-штаммы микроорганизмов в лиофилизированном виде хранятся при температуре (6 ± 2) °C в течение 24 мес.

Допускается не более 5 пассажей от исходной культуры.

Приготовление тест-штаммов микроорганизмов для испытания Для испытания используют культуры, выращенные в течение (22 ± 2) ч, второго или третьего пассажа, которые инкубируют на адекватной плотной питательной среде в адекватных условиях. Выросшую чистую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида с поверхности плотной питательной среды. Полученную суспензию собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.). Доводят концентрацию микробных клеток в полученной суспензии в соответствии со стандартным образцом мутности 5

ОЕ в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток».

Отбор и подготовка образцов для анализа

Методом случайной выборки отбирают образцы от каждой серии препарата. Посевы проводятся в стерильных условиях.

Пробиотические производственные штаммы-продуценты (лиофилизаты) восстанавливают до первоначально высушенного объема (но не менее 10^7 микробных клеток/мл), добавляя в лиофилизат стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Особенности подготовки испытуемого образца препарата пробиотиков в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):

1. *Лиофилизаты* – разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.
2. *Таблетки* – предварительно растирают в ступке (асептически) до гомогенного состояния дробно добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.
3. *Порошки* – содержимое пакета (саше) высыпают в пробирку, содержащую 25 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, и перемешивают путем энергичного встряхивания в течение 10 мин.
4. *Капсулы* – содержимое капсулы вносят в пробирку, добавляют 1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают до гомогенного состояния.
5. *Суппозитории* – вносят в пробирку, добавляют до общего объема 10 мл стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, предварительно нагретый до температуры $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Пробирки с суппозиториями помещают на водяную баню при температуре $(39 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Через 10–30 мин содержимое пробирок перемешивают до гомогенного состояния и освобождают от жировой основы (как описано выше в разделе 2).

Методика испытания

Полученную суспензию испытуемого образца перемешивают и

высевают бактериологической петлей диаметром $(3,5 \pm 0,5)$ мм на 6 чашек Петри с питательной средой, проводя по 2 параллельных штриха длиной, равной диаметру чашки.

После инкубирования в течение 48–96 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в адекватных (аэробных, микроаэрофильных или анаэробных) условиях в зависимости от вида микроорганизма к выросшей культуре испытуемого образца подсевают культуры тест-штаммов (в соответствии с требованиями нормативной документации). Подсев тест-штаммов производят петлей диаметром $(1,75 \pm 0,25)$ мм в направлении, перпендикулярном зоне роста изучаемого микроорганизма, и не касаясь его. Чашки Петри перевернутые вверх дном инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18–20 ч (если нет других указаний в нормативной документации).

Контролем роста тест-штаммов служит их параллельный посев на чашки с той же питательной средой без испытуемой культуры.

Учет результатов

Учитывают величину зоны отсутствия роста тест-штамма, выраженную в мм. Чем больше величина угнетения роста тест-культур, тем выше антагонистическая активность испытуемого штамма.

Если нет других указаний в нормативной документации, антагонистическую активность штаммов-продуцентов, входящих в пробиотики для медицинского применения, считают высокой, если:

- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 20 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в лактосодержащие пробиотики;
- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 15 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в коли-, бифидосодержащие пробиотики.
- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 10 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в споросодержащие пробиотики

**Оценка специфической безопасности
производственных штаммов и
посевных вирусов
кори, паротита и краснухи**

ОФС.1.7.2.0010.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод оценки специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи, используемых для изготовления живых вирусных вакцин.

Метод основан на изучении специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) указанных производственных штаммов вирусов путем интрацеребрального заражения восприимчивых к указанным вирусам обезьян. Этот метод может быть также применен при оценке специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) новых вакцинных штаммов вирусов кори, паротита и краснухи.

Исследованию на остаточную нейровирулентность подвергают каждую новую серию производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи. В процессе хранения производственный штамм должен контролироваться на генетическую стабильность 1 раз в 5 лет.

Животные. Испытания на нейровирулентность следует проводить на обезьянах макака резус, макака мулата или яванская макака. При отсутствии обезьян вида макака исследование материалов, содержащих вирусы кори и паротита, можно провести на зеленых мартышках.

На каждое испытание берут не менее 10 здоровых серонегативных обезьян. В качестве контроля используют дополнительно 4 серонегативные

обезьяны, двум из которых интрацеребрально вводят по 0,5 мл жидкости, собранной с незараженных культур клеток. Две другие обезьяны контрольной группы предназначены для оценки контагиозности производственного штамма (посевого вируса) и должны содержаться в непосредственной близости от опытных животных в течение всего периода наблюдения.

Производственный штамм (посевой вирус) считают не контагиозным, если сыворотки крови контрольных обезьян, содержащихся в непосредственной близости от опытных животных в течение всего периода наблюдения, не содержат специфических антител.

Введение исследуемого материала. Вирусосодержащий материал (жидкий полуфабрикат со стабилизатором) вводят каждой обезьяне по 0,5 мл в зрительные бугры обоих полушарий. Доза вируса кори и паротита для интрацеребрального введения составляет не менее десяти минимальных прививочных доз человека, для вируса краснухи – не менее одной минимальной прививочной дозы человека.

Материал вводят обезьянам под глубоким наркозом, который достигается путем внутримышечного введения препарата для наркоза в соответствии с инструкцией по его применению.

Перед введением исследуемого материала шерсть на голове у обезьян тщательно сбривают, и операционное поле дважды обрабатывают 70 % спиртом и 10 % настойкой йода. В момент заражения кожу головы натягивают назад и фиксируют рукой с целью последующего образования "биологического шва". Для заражения используют иглу длиной 2,3 - 2,5 см и диаметром 0,6 мм. Вирусосодержащую жидкость вводят в трепанационное отверстие, сделанное сверлом диаметром 1,5 мм, отступая 0,5 см назад от коронарного шва и на 1,0 - 1,5 см латеральнее саггитального шва на глубину 2,0 - 2,5 см, в зависимости от размеров черепа животного. Иглу вводят несколько вперед и медиально по направлению к глазу.

Рекомендуемая методика интрацеребральной инокуляции позволяет получить стандартные по топографии и глубине инокуляционные каналы, уменьшить вероятность повреждения стенок желудочков мозга и предупредить развитие посттравматических реакций, затрудняющих достоверную оценку степени нейровирулентности исследуемых материалов. При этом методе инокуляции постинъекционные рубцы располагаются симметрично с обеих сторон в области пре- и постцентральных извилин коры головного мозга, в подкорковых ганглиях (в головке хвостатого ядра, внутренней капсуле) и передних ядрах таламуса.

Серологические исследования. Непосредственно перед началом испытания необходимо убедиться с помощью адекватных серологических методов, что в сыворотке крови всех обезьян отсутствуют антитела к вирусу кори (паротита или краснухи соответственно).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ материал считается успешно прошедшим испытание, если антитела вырабатываются не менее, чем у 80 % вакцинированных обезьян. При этом надо иметь в виду, что у вакцинированных зеленых мартышек антитела к исследуемым вирусам могут вырабатываться у меньшего количества животных (менее 80 %), что делает нецелесообразным исследование у зеленых мартышек наличия антител к вирусу кори и паротита после заражения. В этом случае оценка результатов основывается только на анализе гистологических и клинических данных.

Клинические наблюдения. Наблюдение за обезьянами, используемыми в тесте оценки остаточной нейровирулентности, проводят ежедневно в течение 17-21 сут при исследовании материалов, содержащих вирус кори или краснухи, и в течение 25-28 сут при исследовании материалов, содержащих вирус паротита. Наблюдение за контрольными животными проводят дополнительно еще в течение 10 сут. Животных, погибших в течение первых 48 ч после заражения, заменяют.

В период наблюдения регистрируют общие клинические симптомы и признаки поражения центральной нервной системы. Клинически значимыми

симптомами считают: изменение поведенческих характеристик животных (вялость, беспокойство), нарушение аппетита, повышение температуры тела (нормальная температура обезьян $38 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), различные неврологические нарушения (парезы, параличи, наличие нистагма и косоглазия).

Морфологические исследования. По истечении срока наблюдения животных под глубоким наркозом обескровливают, производят аутопсию и гистологическое исследование головного и спинного мозга.

Из головного мозга каждого животного при испытании вирусов кори и краснухи должно быть исследовано 15 блоков (табл. 1); при контроле вируса паротита – 18 блоков (передние, задние и нижние рога боковых желудочков исследуются в обоих полушариях головного мозга).

Оценка степени нейровирулентности производственного штамма и посевного вируса паротита

При инфицировании ЦНС обезьян вирусом паротита «мишенью» является желудочковая система головного мозга. Для достоверной оценки параметров развивающегося патологического процесса необходимо максимально обследовать все отделы желудочковой системы. Срезы головного мозга производятся на определенных анатомических уровнях, которые вместе с соответствующими отделами желудочковой системы представлены в табл. 1. При вырезке кусочков головного мозга в протоколе обязательно фиксируют наличие инокуляционных каналов, их величину и топографию по отношению к стенкам боковых и третьего желудочков.

Оценке подлежат следующие отделы желудочковой системы:

- 1) передние рога боковых желудочков;
- 2) центральные части боковых желудочков;
- 3) нижние рога боковых желудочков;
- 4) задние рога боковых желудочков;
- 5) третий желудочек;
- 6) силвиев водопровод;
- 7) четвертый желудочек.

Парные образования – боковые желудочки – оцениваются отдельно в правом и левом полушарии.

Основным проявлением паротитного процесса в ЦНС обезьян является патоморфологическая триада: хориоплексит, эпендимит и перивентрикулярный энцефалит. Степень выраженности и распространенности этих изменений являются основными морфометрическими параметрами, отражающими нейровирулентные свойства штаммов вируса паротита.

Для оценки интенсивности патоморфологических изменений в желудочковой системе обезьян используют четырехбальную шкалу:

1 балл (минимальные изменения). Один-два небольших лимфогистиоцитарных инфильтрата в строме сосудистого сплетения; слабая диффузная лимфоидная инфильтрация стромы сосудистого сплетения, единичные мелкие васкулиты в субэпендимарной зоне (СЭЗ).

2 балла (умеренные изменения). Три и более умеренно выраженных очаговых лимфогистиоцитарных инфильтратов в строме сосудистого сплетения; несколько васкулитов и/или умеренная диффузная инфильтрация стромы сосудистого сплетения и СЭЗ, умеренные дистрофические изменения и очаговая пролиферация эпендимного эпителия.

3 балла (выраженные изменения). Три и более выраженных инфильтратов в строме сосудистого сплетения, множественные васкулиты в СЭЗ; интенсивная диффузная инфильтрация вентрикулярной стенки на значительном протяжении; частичная дегенерация эпендимной выстилки наряду с интенсивной пролиферацией эпендимного эпителия и образованием папилломатозных выростов; субэпендимарный отек; адгезия воспаленного сосудистого сплетения к стенкам желудочка.

4 балла. Интенсивная воспалительная инфильтрация СЭЗ и стромы сосудистых сплетений; тяжелая дегенерация и десквамация эпендимного эпителия; некроз петель плексусов; адгезия сосудистого сплетения к вентрикулярным стенкам вплоть до полной обтурации полости желудочка;

поражение нейронов вне зоны инокуляционной травмы вне зависимости от степени поражения желудочковой системы.

Оценка степени нейровирулентности производственного штамма и посевного вируса кори (краснухи)

Степень выраженности морфологических изменений в месте введения вирусосодержащего материала, а также наличие и распространенность энцефалита, являются основными морфометрическими параметрами, отражающими нейровирулентные свойства вакцинного штамма вируса кори (краснухи).

Основные патоморфологические изменения возникают в месте инокуляции и сопровождаются развитием воспалительной реакции, очаговой демиелинизации, пролиферации глии и дистрофических изменений нервных клеток. При наличии инокуляционного повреждения желудочковой системы вакцинный вирус кори (краснухи) вызывает развитие преимущественно перивентрикулярного очагового энцефалита.

При вырезке кусочков головного мозга в протоколе обязательно фиксируют наличие инокуляционных каналов, их величину и топографию по отношению к стенкам боковых и третьего желудочков.

Для оценки интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян используют четырехбалльную шкалу:

1 балл (минимальные изменения). Один-два лимфогистиоцитарных инфильтрата умеренной выраженности и/или слабая диффузная лимфоидная инфильтрация в строме сосудистого сплетения; обратимые дистрофические изменения единичных нервных клеток в перитравматической зоне, слабая диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов по ходу сосудов и проводников, единичные васкулиты и/или слабая лимфоидно-клеточная инфильтрация в перитравматической зоне.

2 балла (умеренные изменения). Умеренная диффузная или диффузно-очаговая инфильтрация стромы сосудистого сплетения, умеренные дистрофические изменения и умеренная очаговая пролиферация

эпендимного эпителия; умеренная диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов вокруг сосудов и по ходу проводящих путей и/или умеренные дистрофические изменения большей части нейронов в перитравматической зоне.

3 балла (выраженные изменения). Выраженные инфильтраты в строме сосудистого сплетения; частичная дегенерация эпендимной выстилки наряду с участками интенсивной пролиферации эпендимного эпителия; множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации и/или выраженные дистрофические изменения и деструкция нервных клеток в перитравматической зоне.

4 балла. Множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации в паренхиме мозга и/или выраженные дистрофические изменения и деструкция нервных клеток за пределами перитравматической зоны.

Критерии пригодности серий производственного штамма и посевного вируса паротита, кори, краснухи по результатам оценки остаточной нейровирулентности в тесте на обезьянах

Контроль считается недействительным и должен быть повторен, если:

- 1) более 20 % обезьян погибает от неспецифических причин, установленных патологоанатомическим вскрытием;
- 2) менее чем у 80 % зараженных обезьян имеется микроскопическое подтверждение инокуляционной травмы в таламической области;
- 3) в случае развития однотипных поражений в ЦНС обезьян опытной и контрольной групп.

При оценке результатов теста на остаточную нейровирулентность производственные штаммы и посевные вирусы кори, паротита и краснухи, считают не нейровирулентными, если:

1) у вакцинированных обезьян отсутствуют клинические симптомы поражения центральной нервной системы в течение всего периода наблюдения;

2) при гистологическом исследовании головного мозга обезьян отсутствуют изменения на 4 балла, а изменения на 3 балла отмечаются не более, чем у одного животного.

Результаты оценки степени нейровирулентности заносятся в протоколы (табл. 2 – образец протокола для вирусов кори и краснухи; табл. 3 – для вируса паротита).

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Приложение

Таблица 1 – Срезы головного мозга и соответствующие отделы ЦНС, подлежащие гистологическому исследованию

№ п/п	Анатомический уровень среза	Отделы ЦНС, подлежащие исследованию	Условные обозначения
1	Фронтальный срез впереди передней спайки	Лобная зона коры (верхняя лобная извилина)	Л
		Передние рога боковых желудочков и отделы подкорковых ганглиев: головка хвостатого ядра, передняя ножка внутренней капсулы, чечевицеобразное ядро	А
2	Фронтальный срез на уровне сосцевидных тел	Двигательная зона коры (прецентральная извилина)	Д
		Центральные части боковых желудочков, третий желудочек, хвостатое ядро, таламус, внутренняя капсула, чечевицеобразное ядро	Г
3	Фронтальный срез через ножки мозга и мост	Теменная зона коры (постцентральная извилина)	Т
		Центральные части боковых желудочков и третий желудочек, тело хвостатого ядра, ядра таламуса, задняя ножка внутренней капсулы	У
		Гиппокамп; нижние рога боковых желудочков	Нр
4	Фронтальный срез через борозду птичьей шпоры	Затылочная зона коры	З
		Задние рога боковых желудочков	Зр
5	Поперечный разрез среднего мозга через пластинку четверохолмия	Сильвиев водопровод, черное вещество, ядра среднего мозга	хххх
6	Поперечный разрез моста на уровне выхода тройничного нерва	Оральная часть четвертого желудочка, собственные ядра Варолиева моста и расположенные в нем участки проводящих путей	ххх
7	Поперечный разрез ствола на границе между мостом и продолговатым мозгом	Центральная часть четвертого желудочка, ядра и участки проводящих путей, расположенные в дне ромбовидной ямки	хх
8	Поперечный срез продолговатого мозга	Каудальная часть четвертого желудочка, ядра олив, ретикулярная формация, ядра черепно-мозговых нервов, участки проводящих путей	х
9	Поперечный срез спинного мозга на уровне шейного утолщения	Шейный отдел спинного мозга: ядра серого вещества и проводящие пути белого вещества	Ш. о.
10	Поперечный срез спинного мозга на уровне поясничного утолщения	Поясничные отдел спинного мозга	П. о.

Таблица 2 – Протокол «Оценка интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян, заражённых вирусом кори (краснухи)»

Вид обезьян Дата инокуляции		Исследуемый вирус										Титр при инокуляции Дата забоя обезьян			
Номера обезьян	Интенсивность патоморфологических изменений в баллах														
	Условные обозначения отделов ЦНС обезьян, подлежащих гистологическому исследованию														
	Отделы головного мозга													Отделы спинного мозга	
	Л	А	Д	Г	Т	V	НР	ЗР	З	X X X X	X X X X	X X X X	X	Ш.о	П.о.
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															

Примечание: «Л», «А» и т.д. – обозначения отделов ЦНС представлены в табл. 1.

Таблица 3 – Протокол «Оценка интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян, заражённых вирусом паротита»

Вид обезьян Дата инокуляции		Исследуемый вирус										Титр при инокуляции Дата забоя обезьян					
Номера обезьян	Интенсивность патоморфологических изменений в баллах																
	Условные обозначения отделов ЦНС обезьян, подлежащих гистологическому исследованию																
	Отделы головного мозга														Отделы спинного мозга		
	Л	А	ПР	Д	Г	Т	V	НР	ЗР	З	X X	X X X	X X	X	Ш.о	П.о.	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	

Примечание: «Л», «А» и т.д. – обозначения отделов ЦНС представлены в табл. 1.

**Требования к клеточным культурам -
субстратам производства иммунобио-
логических лекарственных препаратов**

ОФС.1.7.2.0011.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к первичным и перевиваемым (диплоидным и гетероплоидным) клеточным культурам (КК) человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин. Применение КК для производства и контроля иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) основано на системе создания главного (ГБК) и рабочего (РБК) банков клеток.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Клеточная линия (КЛ) — популяция клеток с определенными характеристиками, полученная путем последовательного субкультивирования первичной ткани донора в системе *in vitro*.

Посевной пул клеток (ППК) — клеточная линия, полученная из одного вида ткани донора на определенном уровне пассажа и сохраняемая в контейнерах в равных частях однородного состава при температуре не выше минус 70 °С. Один или несколько контейнеров используются для создания главного банка клеток.

Главный банк клеток (ГБК) — запас клеток, полученных из одного посевного пула клеток, сохраняемых в контейнерах в равных частях однородного состава на определенном уровне пассажа при температуре не выше минус 70 °С. Предназначен для последующего создания рабочего банка клеток.

Рабочий банк клеток (РБК) — запас клеток однородного состава, полученных из ГБК на определенном уровне пассажа, сохраняемых в контейнерах в равных частях при температуре не выше минус 70 °С. Используются для получения производственной клеточной культуры.

Производственная клеточная культура — клетки, полученные из РБК и используемые для производства ИЛП.

Первичные клеточные культуры (ПКК) — культуры, полученные из клеток тканей или органов, взятых от одного или более организмов, которые выращиваются *in vitro* от начала субкультивирования.

Диплоидные клеточные культуры (штаммы) (ДКК) — морфологически однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с ограниченным сроком жизни, сохраняющая диплоидный кариотип, идентичный донору.

Гетероплоидные клеточные культуры (ГКК) — однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с неограниченным сроком жизни, сохраняющая стабильность биологических характеристик в течение установленного срока культивирования.

Посторонние агенты — бактерии (в том числе, микобактерии, риккетсии, микоплазмы), грибы, вирусы, прионы (в том числе, вызывающие трансмиссивные губчатые энцефалопатии крупного рогатого скота), и др. которые случайно попали в ИЛП в ходе производственного процесса.

ДНК инфекционная — вирусная ДНК, способная внедряться в клеточную ДНК и вызывать образование пролиферирующих клонов.

Удвоение популяции — удвоение количества клеток при митотическом делении.

Онкогенность — свойство биологических агентов (вирусов, нуклеиновых кислот, клеточного субстрата, химических веществ, субклеточных элементов и др.) вызывать онкогенную трансформацию клеток при введении животным (при этом опухоль состоит из клеток хозяина).

Туморогенность — способность клеток образовывать опухоли у чувствительных животных в месте введения, возможно с образованием метастазов (опухоль состоит из инокулированных клеток).

Пассаж — перенос клеток из одного культурального сосуда в другой для размножения и накопления необходимого количества клеточной массы.

Эндогенный вирус (например, ретровирус) — вирус, геном которого интегрируется в геном чувствительной клетки хозяина и наследуется ее потомками.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Использование в качестве субстрата для производства перевиваемых клеточных линий (ДКК и ГКК) возможно только при создании системы клеточных банков.

Процесс производства ИЛП в клеточных культурах основан на современной технологии, обеспечивающей высокую степень очистки получаемого продукта от клеточных компонентов и контаминирующих агентов, в том числе эндогенных вирусов, клеточной и инфекционной ДНК. Технологический процесс должен быть валидирован.

Клеточные культуры, используемые в производстве ИЛП, получаемые из тканей животных и птиц, должны быть стерильными, жизнеспособными, морфологически однородными, неонкогенными, нетуморогенными и не содержать посторонних агентов.

При производстве ИЛП путем культивирования клеточных культур должны использоваться культуральные питательные среды, сыворотки, трипсин и другие реактивы, разрешенные в производстве иммунобиологических препаратов.

Результаты, полученные при изучении и аттестации главных (ГБК) и рабочих (РБК) банков клеток, оформляют в виде паспорта и передают для рассмотрения вместе с протоколами исследований и материалами по контролю и аттестации в установленном порядке, в котором должны быть отражены следующие показатели:

1. Наименование клеточной культуры;
2. Коллекционный шифр (клеточной линии, ГБК, РБК);
3. История получения (происхождение) клеточной культуры и создания ГБК и РБК;
4. Запас клеток (количество сохраняемых контейнеров в банках клеток, количество клеток в емкости);
5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;
6. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания;
7. Ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда, посевная концентрация, метод снятия клеток, кратность посева, температура культивирования, частота пассирования);
8. Подлинность (морфология, кариологическая характеристика, молекулярно-генетические методы исследования);
9. Стерильность (отсутствие микробных агентов, в том числе микоплазм);
10. Присутствие посторонних вирусов, в том числе эндогенных;
11. Туморогенность (если применимо);
12. Онкогенность (если применимо);
13. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных для производства пассажей);
14. Сфера применения, чувствительность к производственному штамму вируса.

2. Первичные клеточные культуры (ПКК)

Для приготовления первичных клеточных культур материал должен быть получен от животных, свободных от патогенной флоры, из предварительно обследованных хозяйств, если иное не предусмотрено нормативной документацией.

ПКК высоко чувствительны к различным вирусам. Однако наличие контаминации может приводить к изменению чувствительности ПКК к

вакцинным штаммам вирусов, что делает их менее пригодным субстратом по сравнению с перевиваемыми (диплоидными и гетероплоидными) клеточными линиями.

3. Диплоидные клеточные культуры (ДКК)

ДКК получают из тканей или органов здорового донора (человека или животного), не имеющего в генеалогии онкологических, венерических и генетических заболеваний, врожденных аномалий, заболеваний гепатитами, туберкулезом и СПИД. ДКК получают общепринятыми методами дезинтеграции клеток. После формирования клеточного монослоя культуру периодически пассируют (один-два раза в неделю). В результате пассирования клетки становятся перевиваемыми линиями, сохраняющими диплоидный кариотип со структурой, идентичной донору. ДКК растут в богатых витаминами и минеральными солями питательных средах с содержанием 10-15 % сыворотки крови плодов крупного рогатого скота.

ДКК должны иметь ограниченный срок жизни, стабильный кариотип ($2n$ не менее 75 %), не содержать посторонних агентов (бактерий, в том числе, микоплазм, грибов, простейших, вирусов), сохранять стабильность всех биологических свойств в фазе активного роста (первые две трети срока жизни клеточных культур), обладать высокой чувствительностью к заражению специфическими агентами. Как правило, у ДКК отсутствует онкогенная и туморогенная активность.

4. Гетероплоидные клеточные культуры (ГКК)

ГКК могут быть получены при: серийном субкультивировании первично-трипсинизированных клеток опухолей человека или животных; трансформации нормальных клеток с ограниченным сроком жизни онкогенным вирусом (например, В-лимфоциты, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр); серийном субкультивировании первично-трипсинизированных нормальных культур с выделением доминантной популяции спонтанно трансформированных клеток (например, *Vero*, ВНК-21,

СНО, MDCK); слиянии миеломных клеток с В-лимфоцитами, продуцирующими антитела (гибридомы).

Основными преимуществами ГКК являются: возможность получения полной характеристики клеточной линии, нетребовательность к составу питательной среды, возможность адаптации к росту в бессывороточной среде, получение больших объемов в биореакторах, на микроносителях или в суспензии.

ГКК должны иметь неограниченный срок жизни, типичную морфологию для данной линии, зимограмму и иммунологические маркеры, характерные для донора клеток, кариотип, определяющий видовую принадлежность клеточной культуры донора, обладать онкогенной и туморогенной безопасностью, высокой чувствительностью к заражению специфическим агентом, сохранять стабильность всех биологических свойств в течение срока, рекомендуемого для производства ИЛП.

Вместе с тем, ГКК могут содержать и экспрессировать эндогенные вирусы, в том числе онкогенные, что не исключает теоретический риск онкогенной и инфекционной опасности готового продукта, связанной с остаточной клеточной ДНК и/или трансформирующими белками. Поэтому возможность использования таких клеток для получения ИЛП должна быть обоснована. В этом случае вопрос об их применении в качестве субстрата оценивается решением польза/риск.

Препараты, изготовленные на гетероплоидных тканевых культурах, должны быть исследованы на содержание остаточной клеточной ДНК.

5. Криоконсервация

Среда для криоконсервации обычно состоит из базовой питательной среды, криопротектора и источника белка и подбирается в зависимости от вида культуры. В качестве криопротектора широко применяются глицерин или диметилсульфоксид (ДМСО), которые быстро проникают в клетки и прочно связывают в ней воду. Возможно также использование других криопротекторов.

Для криоконсервации клетки ресуспендируют в смеси, состоящей из 80 % питательной ростовой среды, 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 10% глицерина (или ДМСО), разливают в ампулы, вместимостью 2,0 или 5,0 мл и замораживают в сосудах Дюара с жидким азотом. При замораживании температуру снижают постепенно на 1 °С в минуту до минус 25 °С, затем до минус 70 °С. Возможно использование других методов криоконсервации. Клеточные культуры могут храниться при температуре минус 196 °С в течение 10 и более лет.

После размораживания следует исследовать жизнеспособность клеток, определяя их количество путем подсчета живых и погибших клеток после окрашивания. Для определения физиологического состояния клеток «сохранные»/«поврежденные» широко применяется окрашивание 0,1 % раствором трипанового синего в гемоцитометрах.

6. Методы испытания клеточных культур

Морфология

Для морфологического изучения клеточные культуры выращивают на предметных или покровных стеклах в течение 48-72 ч, фиксируют 96 % этиловым спиртом или жидкостью Карнуа в течение 10 -15 мин при температуре от 20 до 22 °С, окрашивают гематоксилин-эозином или азури-эозином и просматривают в световом микроскопе. В нормативной документации могут быть указаны иные условия приготовления препаратов. Определяют тип роста клеток (эпителиоподобный или фибробластоподобный), гомогенность цитоплазмы, наличие эозинофильных включений, характерные особенности ядра, ядрышек и др. органелл.

Необходимо также описывать оптимальные условия и способ культивирования: стационарный, роллерный, суспензионный или псевдосуспензионный, на микроносителях (декстрановых, покрытых коллагеном или желатином, целлюлозных или полистироловых). Должны быть представлены: посевная доза, метод снятия клеток, кратность посева, частота пассирования.

Для изучения морфологии клеток применяют также метод электронной микроскопии, высокая разрешающая способность которого позволяет выявлять дифференцировку клеток, различать их тончайшие структуры и наличие многочисленных клеточных органелл.

Определение видовой идентичности

В процессе пассирования клеточных культур возможна видовая и внутривидовая контаминация одних клеточных линий другими. Разработка методов идентификации клеточных культур предполагает определение и изучение стабильности клеточных признаков. С этой целью разработаны и применяются методы электрофореза, кариологического анализа хромосом и молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Основными биохимическими маркерами, специфичными для данного вида донора, позволяющими определять внутривидовую и видовую контаминацию клеточных культур, является анализ полиморфизма изоферментов, обладающих одинаковой специфичностью к субстрату. Такими изоферментами являются глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ), лактат-дегидрогеназы (ЛДГ), нуклеозидфосфоорилаза (НФ) и др.

Метод основан на сравнении электрофореграммы изоферментов исследуемой линии клеток с электрофореграммой изоферментов клеток известного вида донора. Каждому виду соответствует определенный набор изоферментов. Совпадение электрофоретической подвижности полос в опытном и контрольном (стандартном) образцах позволяет заключить, что исследуемые клетки принадлежат данному виду.

Изоферменты можно выявить при помощи электрофореза в полиакриламидном, агарозном гелях или на пленках из ацетата целлюлозы. В настоящее время используют в основном агарозные и полиакриламидные гели. Различные изоферменты мигрируют с различной скоростью и по окончании электрофореза могут быть выявлены окрашиванием с соответствующим хромогенным субстратом. Учет результатов на

окрашенных гелях (зимограммах) может быть проведен визуально или денситометрией зимограммы (или ее фотографии) (ОФС «Электрофорез»).

Видовая контаминация клеток может быть также выявлена при помощи гель-электрофорезной системы Authentikit, которая позволяет выявлять до 7 различных видов изоферментов.

Метод кариологического анализа хромосом

Метод кариологического анализа хромосом предназначен для определения стабильности кариотипа культур клеток в соответствии с требованиями к кариологическим параметрам видовой идентификации клеток, основанной на сравнении кариотипа испытуемого образца со стандартным образцом с нормальным кариотипом известного вида. Совпадение по кариотипу испытуемого и стандартного образцов позволяет заключить, что испытуемый образец принадлежит данному виду.

Кариологический анализ хромосом проводят на фиксированных препаратах в период митотической активности клеток, используя методы дифференциального окрашивания (C, G, Q и R).

Получение препаратов для кариологического анализа хромосом.

Испытуемые клетки в концентрации от $1,5 \cdot 10^5$ до $2,0 \cdot 10^5$ в 1,0 мл выращивают во флаконах при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 36-48 ч после посева клеток во флакон вносят колхицин из расчета 0,1 мл 0,04 % раствора на 1 мл питательной среды и оставляют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 4-5 ч питательную среду сливают, клетки снимают с подложки 0,25 % раствором трипсина, центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в гипотоническом растворе калия хлорида и оставляют на 20 мин при температуре 37°C . Затем к клеткам добавляют смесь для фиксации, состоящую из 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Клетки фиксируют при температуре от 8 до 10°C в течение 30 мин. Смену фиксатора повторяют 2 - 3 раза с промежуточным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Несколько капель суспензии в фиксаторе наносят на влажные и охлажденные до температуры от 8 до 10 °С предметные стекла и высушивают в струе теплого воздуха.

Для подсчета модального класса и полиплоидии хромосом клетки окрашивают 1 % раствором красителя азур-эозина по Романовскому-Гимзе.

Дифференциальное окрашивание С-методом применяют для выявления структурного гетерохроматина, локализованного в околоцентрических и центромерных районах хромосом, в коротких плечах акроцентрических аутосом и в длинном плече Y-хромосомы.

Дифференциальное окрашивание G-методом применяют при выявлении структурных перестроек и для идентификации маркерных хромосом. Метод позволяет идентифицировать каждую хромосому.

Дифференциальное окрашивание Q-методом применяют для идентификации Y-хромосомы и структурных перестроек. Он основан на окрашивании флюорохромами с двумя производными акрихина – акрихин-дигидрохлоридом и акрихин-ипритом с исследованием в люминисцентном микроскопе.

Дифференциальное окрашивание R-методом выявляет различия в окрашивании гомологичных G- или Q-негативных участков сестринских хроматид или гомологичных хромосом, что подтверждает специфичность и стабильность рисунка полос для каждой хромосомы.

Отбор клеток, находящихся в метафазе, для подсчета полиплоидии и выявления aberrаций хромосом, следует проводить по принципу общей цитологической пригодности.

Частоту полиплоидии (2n, 4n и т.д.) в популяции делящихся клеток определяют под микроскопом на основании подсчета в метафазных пластинках.

Точный подсчет хромосом и изучение структурных нарушений проводят с масляной иммерсией (объектив микроскопа 90х).

При цитогенетическом анализе, как правило, учитывают: число исследованных метафаз, число aberrаций, число aberrантных клеток, типы aberrаций и их частоту, распределение aberrаций по группам хромосом. Для изучения клеточных культур банка рабочих клеток необходимо исследовать как минимум 500 метафазных пластинок на уровне производственного или любого следующего пассажа на чистоту полиплоидии, провести точный подсчёт хромосом, определить частоту разрывов хромосом, структурных нарушений, деспирализацию или заметное ослабление первичных или вторичных перетяжек.

Для определения кариотипа отбирают метафазные пластинки для последующей компьютерной обработки препаратов.

Молекулярно-генетические методы идентификации клеточных культур

Описанный выше метод является информативным и специфичным, однако длительность проведения анализа и необходимость в профессиональных навыках оператора делают его трудоемким для выполнения и сложным для интерпретации.

В настоящее время более широкое применение получил метод мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами.

Метод основан на выявлении видоспецифических участков митохондриальной ДНК (мтДНК) в области гена, кодирующего субъединицу 1 цитохром с-оксидазы (COX1) и цитохрома b с помощью видоспецифичных праймеров с детекцией результатов с помощью электрофореза и ПЦР в реальном времени. Реакция проводится в соответствии с инструкциями по применению тест-систем после валидации методики.

В последние годы широкое распространение получили молекулярно – генетические методы идентификации клеточных культур. Таким способом оценки генетического соответствия клеточной линии является секвенирование полноразмерного генома исследуемого образца с последующим сравнением с эталонным штаммом.

Иммунологические методы идентификации клеток

Иммунологические методы идентификации клеток включают реакцию гемагглютинации, метод смешанной агглютинации, реакцию гемадсорбции, иммунофлуоресценции (РИФ), определение антигенов гистосовместимости и различия в чувствительности клеток разных видов животных к отдельным группам вирусов. Существует также ряд методов, основанных на применении специфического связывания антител с клеточной поверхностью: иммунный лизис (используют антитела к нежелательным клеткам, например фибробластам в популяции эпителиальных клеток), направленная доставка цитотоксина, сортировка клеток с активацией флуоресценции или на магнитных гранулах с иммобилизованными антителами.

Изучение туморогенности

Для оценки туморогенной активности клеток используются две биологические системы — *in vivo* и *in vitro*. Испытанию подлежат клетки из ГБК или РБК, субкультивированные в течение не менее трех пассажей, превышающих рекомендованные для производства ИЛП.

В системе *in vivo* используют иммуносупрессированных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных (например, бестимусные мыши с мутацией по гену *nude*, мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИ) или с супрессией функции Т-клеток антитимоцитарным глобулином (АТГ), антитимоцитарной (АТС) или антилимфоцитарной (АЛС) сыворотками).

Наиболее подходящей моделью, позволяющей получать достоверные и стандартные результаты для выявления туморогенности клеток, являются взрослые мыши *nude*.

Изучение туморогенности в системе *in vivo* на бестимусных мышах

Взрослым самкам мышей линии Balb/c с мутацией по гену *nude* (генотип *nu/nu*) массой 19 – 20 г (не менее 30 голов) подкожно или внутримышечно вводят по 1 млн клеток исследуемой клеточной культуры. Контрольной группе мышей (30 животных) вводят по 1 млн заведомо

туморогенных клеток (например, линии HeLa). Мышей содержат в специализированном кондиционированном виварии.

За животными опытной и контрольной групп наблюдают в течение 21 сут. Животных обследуют ежедневно путем пальпации места инокуляции клеток и лимфатических узлов (регионарных, аксиллярных и подколенных). Оценивают общее состояние мышей и отдельно фиксируют гибель животных, связанную с наличием иммунодефицита и появление опухолевого роста. Образовавшиеся узлы измеряют штангенциркулем (в мм) и вычисляют объем V_{cp} по формуле:

$$V_{cp} = a \cdot b \cdot c,$$

где: a – длина, b – ширина, c – высота опухоли

После окончания срока наблюдения проводят эвтаназию животных и при макроскопическом исследовании определяют наличие узлов в месте введения клеток, в лимфатических узлах, легких, почках, печени и селезенке. Все поражения, напоминающие опухоли, а также лимфатические узлы и органы всех животных исследуют гистологически.

Если изучаемые клетки являются заведомо туморогенными, следует определить уровень их туморогенности, основанный на расчете значения 50% туморопродуцирующей дозы (ТПД₅₀). Для расчета ТПД₅₀ изучаемые клетки вводят экспериментальным животным в дозах 10^7 ; 10^5 ; 10^3 и 10^1 и данные выражают как 50 % доза опухолеобразования (ДОО₅₀).

Изучение туморогенности в системе *in vitro* методом инвазивности в органы культуры

Метод основан на внесении испытуемых клеток в органную культуру кожи куриного эмбриона и состоит из нескольких этапов:

- приготовление эмбрионального экстракта из мышечной ткани 7 сут куриных эмбрионов;
- приготовление питательной среды, состав которой состоит из 100 мл раствора Эрла, 20 mM HEPES, 4,0 мл куриного эмбрионального

экстракта, 4,0 мл сыворотки крови плода коровы, 10 мл 1% агара, разогретого до температуры 40 – 50 °С, и антибиотиков.

Среду разливают в лунки пластиковой панели, закрывают крышкой и оставляют при температуре 20 – 22 °С до застывания среды.

После этого в лунку со средой помещают фрагмент кожи (5-7 мм) 9 сут куриного эмбриона. Испытуемые клеточные культуры снимают с подложки общепринятым методом, ресуспендируют в питательной среде 199, и на три кожных фрагмента наносят по 1,0 мл испытуемой клеточной суспензии в виде капли в концентрации 10^6 кл/мл.

Таким же образом на 2 - 3 кожных фрагмента наносят суспензию клеток HeLa (положительный контроль). В качестве отрицательного контроля оставляют 2 - 3 неинокулированных фрагментов кожи.

Панель закрывают крышкой и инкубируют в атмосфере CO₂ при температуре 36 - 37 °С.

Через 72 ч инкубации готовят гистологические препараты фрагментов кожи толщиной по 5 – 7 микрон и окрашивают гематоксилин-эозином.

Опыт учитывают, если:

а) в контрольных фрагментах кожи не отмечено признаков деструкции органной культуры;

б) в положительном контроле имеются признаки инвазии испытуемых клеток в органную культуру кожи куриного эмбриона, т.е. проникновение и распространение пролиферирующих клеток в собственно дерму.

Клетки испытуемых клеточных культур рассматривают как туморогенные, если хотя бы в одном из образцов органной культуры наблюдается инвазивный рост.

Изучение онкогенности

Онкогенная активность клеточного субстрата может быть обусловлена онкогенными компонентами, присутствующими в клетке (клеточной или вирусной ДНК, РНК или трансформирующими белками).

На наличие онкогенности исследуют клетки, субкультивированные в системе *in vitro* в течение не менее трех пассажей, превышающих рекомендованные для производства ИЛП.

Изучение онкогенности проводят в системе *in vivo*, как указано в разделе «Испытание туморогенности», вводя экспериментальным животным клеточный лизат.

Испытание проводят на:

- новорожденных бестимусных мышах (генотип Nu/Nu) не старше 24 ч;
- новорожденных крысах или хомяках (не старше 24 ч);
- новорожденных мышах линии NIH Swiss.

Для снижения риска потенциальной опасности остаточной ДНК необходимо:

- контролировать методом ПЦР количество гетерогенной ДНК в препаратах, вводимых парентерально;
- чтобы количество ДНК в одной человеческой дозе ИЛП составляло не более 10,0 нг;
- проводить валидацию методов инактивации и очистки инаktivированных препаратов, которые должны обеспечивать дефрагментацию и снижение количества гетерогенной ДНК в ИЛП;

В препаратах, вводимых перорально, количество гетерогенной ДНК не определяют. Однако при разработке такого продукта следует учитывать особенности производственного процесса с целью уменьшения количества остаточной клеточной ДНК.

Испытание клеточных культур на присутствие посторонних агентов

Испытание ИЛП на присутствие посторонних вирусов проводят на клеточных культурах, лабораторных животных и куриных эмбрионах в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Испытание клеточных культур на стерильность проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Если субстратом производства является культура клеток птичьего происхождения, испытание на присутствие микобактерий туберкулеза проводят на адекватных питательных средах. Исследуемый материал высевает на среду Левенштейна—Йенсена в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Выявление микоплазм проводят микробиологическим и цитохимическим методами (ОФС «Испытание на присутствие микоплазм»). В качестве дополнительного метода может быть применена ПЦР.

Испытание на эндогенные ретровирусы проводят электронно-микроскопическим методом, с помощью ПЦР, а также методами иммунофлюоресценции или ИФА с использованием адекватных тест-систем в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

Если в испытуемых клетках проявляется активность обратной транскриптазы, необходимо провести испытание на определение инфекционной способности, связанной с реплицирующимся вирусом.

Электронная микроскопия позволяет изучать ультратонкие срезы клеток и получать изображения вирусов-контаминантов.

Сыворотка крови крупного рогатого скота и трипсин, применяемые при культивировании клеточных культур, должны быть проверены на присутствие вирусов, бактерий (включая микоплазмы) и грибов. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

Для инактивации потенциальных вирусов-контаминантов возможно использовать γ -облучение. Если используется облучение, дозы должны быть достаточно низкими и не изменять биологические свойства облучаемых материалов.

Испытание сыворотки и трипсина на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность» и ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

В качестве дополнительных методов для выявления вирусов (парвовируса свиней типа 1, цирковировусов свиней 1 и 2 типов, аденовирусов, вирусов, вызывающих гастроэнтериты, вирусов энцефалита свиней и др.) возможно использование иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

Для инактивации потенциальных вирусов-контаминантов возможно использовать γ -облучение. Если используется облучение, его дозы должны быть достаточно низкими и не изменять биологические свойства облучаемых материалов.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Производственные пробиотические
штаммы и штаммы для контроля
пробиотиков**

ОФС.1.7.2.0012.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на штаммы микроорганизмов, используемые для производства пробиотиков для медицинского применения. Для производства пробиотиков для медицинского применения используют производственные штаммы микроорганизмов с подтвержденным клиническим терапевтическим действием, депонированные в национальной или международной коллекции.

В настоящей общей фармакопейной статье изложены требования к отбору, проверке и хранению рекомендуемых штаммов микроорганизмов (система предрегистрационного доклинического изучения безопасности рекомендуемых штаммов), требования к системе надзора за производственными и посевными культурами, используемыми при производстве пробиотиков, требования к биологическим свойствам тест-штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для контроля антагонистической активности производственных штаммов и готовых лекарственных форм пробиотиков.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Идентификация и дифференциация бактерий – определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов и их свойств – наиболее ответственный этап микробиологического исследования. Он

осуществляется на основании изучения комплекса фенотипических и генотипических свойств микроорганизмов.

Организмы, обладающие одинаковыми генотипами, в разных условиях могут отличаться по фенотипу, т.е. может наблюдаться некоторое разнообразие фенотипов.

В ходе идентификации микроорганизмов определяют ряд фенотипических признаков: морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные свойства, антигенная структура, спектр чувствительности к антибиотикам, бактериофагам и бактериоцинам, токсигенность; а также характеризуют их генотип – определяют нуклеотидный состав ДНК и содержание Г+Ц-пар в ДНК, степень гомологии ДНК, профиль плазмидной ДНК, электрофоретип, степень вирулентности.

Идентификацию штаммов по генотипическим признакам проводят по степени ДНК – ДНК-гибридизации и содержанию Г+Ц пар нуклеотидных оснований. В настоящее время приемлемым способом является идентификация 16S рРНК, выявляющая консервативные нуклеотидные последовательности исследуемых микроорганизмов.

При характеристике микроорганизмов следует использовать генетические и фенотипические методы, позволяющие сопоставлять последовательности генов и фенотипические признаки исследуемых культур микроорганизмов с музейными штаммами национальных или международных коллекций.

Для дифференцирования патогенных и апатогенных штаммов внутри вида информативным методом является обнаружение в составе ДНК бактериальной клетки геномных «островков» патогенности. Повышенная их лабильность связана с тем, что они могут входить в состав транспозонов, плазмид и включаться в геном бактериофагов, формируя у разных непатогенных видов бактерий вирулентность.

Все перечисленные исследования должны выполняться в аккредитованной лаборатории с использованием современного оборудования

и технологий.

К пробиотическим производственным штаммам предъявляются следующие требования.

1. Предлагаемый штамм должен быть идентифицирован до вида по фено- и генотипическим признакам и по профилю плазмидной ДНК. Штамм, имеющий R-плазмиды, транспозоны, конвертируемые бактериофаги (профаги), не может быть использован при производстве пробиотиков. При обнаружении других разновидностей плазмид следует представить материалы по характеристике их функциональных свойств. Устойчивость штамма к антибиотикам должна быть обусловлена только хромосомной природой, что необходимо подтверждать при ее выявлении.

2. Генетически модифицированные микроорганизмы должны стабильно экспрессировать клонированные целевые гены и при многократном пассировании *in vivo* на культуре клеток или при введении лабораторным животным должны сохранять исходные биологические свойства. Должны быть экспериментально установлены отсутствие неконтролируемой передачи клонированной ДНК «новым хозяевам» и невозможность широкого распространения их плазмид, следствием чего может быть нарушение микробной экосистемы; т.е. должна быть доказана их биобезопасность. Рекомбинантная ДНК, используемая для получения генетически модифицированных штаммов микроорганизмов, не должна содержать маркеров антибиотикорезистентности.

3. Штамм, независимо от вида и рода, должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации. Не допускается образование слизистых колоний пробиотическими производственными штаммами и наличие у них капсул, которые являются признаками вирулентности бактериальных культур. Штамм с неясной характеристикой не может использоваться для производственных целей (раздел 1).

4. Штамм должен быть однороден по физиолого-биохимическим свойствам, охарактеризованным с помощью регламентированных методов или с использованием зарегистрированных тест-систем. Штаммы с неясной биохимической характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных (раздел 1).

5. Штамм не должен продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности, например, каталазу, гиалуронидазу, фибринолизин, плазмокоагулазу, гемолизин, летициназу С, нейраминидазу и др. (раздел 1).

6. Штамм должен обладать антагонистической активностью по отношению к клиническим свежевыделенным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам и сертифицированным тест-штаммам (в соответствии с требованиями нормативной документации). Зона угнетения роста тест-культур должна быть более 10 мм (раздел 2).

7. Штамм не должен обладать высокими адгезивными свойствами (раздел 3).

8. Штамм должен обладать высокой устойчивостью к воздействию желудочного сока, желчи, щелочи или быть защищенным от их воздействия в лекарственной форме пробиотика (раздел 1).

9. Штамм должен быть охарактеризован по способности продуцировать биологически активные вещества (например, ферменты, витамины, кислоты, лизоцим, бактериоцины, антибиотикоподобные вещества и др.) (раздел 1).

10. Штаммы всех видов микроорганизмов, предлагаемые для производства пробиотиков, должны быть неvirulentными, нетоксигенными, нетоксичными, безопасными для людей, включая, при необходимости, иммунологическую безопасность. Исследование осуществляют в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков для медицинского применения» (раздел 3).

11. Штаммы, предлагаемые в качестве кандидатов на применение в составе пробиотика, должны быть изучены на лабораторных моделях для

оценки механизма их терапевтического действия при введении способом, рекомендованным для человека.

12. В готовой форме препарата пробиотика оценивают соотношение терапевтической и безопасной дозы (клинические исследования, фаза I – оценка переносимости, безопасности, терапевтического действия, подтверждение механизма действия), сохранение способности к продукции биологически активных веществ, наличие живых микробных клеток на протяжении срока годности экспериментально-производственных серий препарата.

13. Рекомендуемый для изготовления пробиотических препаратов штамм должен быть депонирован в официальной национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, характеристики его биологических свойств.

Штаммы, используемые при производстве пробиотиков, должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями. Проверка проводится не реже 1 раза в год.

Подлинность. Штамм должен быть идентифицирован до вида с помощью микробиологических методов (например, микроскопического, бактериологического, биохимического и т.п.), которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии (например, амплификация нуклеиновых кислот или секвенирование для подтверждения стабильности генома штамма). Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, биохимическими и культуральными свойствами без признаков диссоциации.

Специфическая безопасность. Безопасность штамма определяется биологическими методами *in vivo* (например, исследованием безвредности, токсичности, токсигенности, вирулентности и т.п.) в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены

методами молекулярной биологии для подтверждения стабильности первоначальных биологических свойств.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием разнообразных селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех вероятных контаминантов. Штамм не должен содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное содержание живых микроорганизмов штамма. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Содержание живых микроорганизмов выражают в определенном объеме (в 1 мл, в 1 дозе, в 1 ампуле/флаконе).

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность штамма в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют микробиологическим методом, например, методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов или методом совместного культивирования (определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков»). Штамм должен проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не должен угнетать рост представителей нормофлоры. Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, характеристики биологических свойств. Перечень тест-штаммов для контроля антагонистической активности определяют на основании результатов клинических (лечебное действие) и микробиологических (влияния на определенную группу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов) испытаний эффективности и безопасности конкретных групп препаратов.

Кислотообразующая активность. Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Хранение и упаковка. Производственный штамм, расфасованный в первичную упаковку (ампулы, флаконы), в лиофилизированном виде хранят при температуре, обеспечивающей его стабильность.

Коллекцию производственного штамма хранят при температуре минус 15 °С и ниже. Производственный штамм регистрируют в специальном журнале, в который вносят всю необходимую информацию о движении культуры (посевах) производственного штамма и результаты его контроля. Ответственность за производственный штамм несет определенный назначенный сотрудник.

Производственный штамм, находящийся в коллекции предприятия, проверяется 1 раз в год по всем показателям, утвержденным в разработанной для него нормативной документации.

Этап получения посевной культуры

Посевную культуру микроорганизмов получают из производственного штамма, выращенного на оптимальной питательной среде (не более 4-го пассажа) в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с последующей лиофилизацией в количестве, необходимом для обеспечения производства посевной культурой на протяжении 1 года, если в нормативной документации не указаны другие требования.

При необходимости использования штамма при производстве лекарственной формы препарата готовят посевную серию штамма в количестве, необходимом для выпуска определенного количества серий препарата. Для этого из коллекции штаммов берут 2 – 3 ампулы полностью проконтролированного штамма и осуществляют его посев на оптимальные для штамма питательные среды. Для высушивания посевной серии штамма

используют 2 —4 пассаж. Штамм может быть высушен в вакуумных ампулах или во флаконах, обеспеченных вакуумной крышкой. На этикетку ампулы или флакона наносят следующие сведения: наименование штамма, порядковый номер серии, дата лиофилизации, срок годности, номер хранилища или контейнера.

Производственную серию штамма контролируют не реже 1 раза в год по основным показателям качества, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Посевная культура должна соответствовать следующим требованиям:

Подлинность. Подлинность посевной культуры определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами без признаков диссоциации.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Специфическая безопасность. Посевная культура должна быть безопасна при внутрибрюшинном, внутривенном, пероральном введении мышам с массой тела 15 ± 1 г. Вид испытания определяется индивидуально в зависимости от видовой принадлежности посевной культуры и способа назначения лечебного препарата. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в опытах *in vivo*».

Количественное содержание живых микроорганизмов штамма. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Содержание живых микроорганизмов выражают в определенном объеме (в 1 мл, в 1 ампуле/флаконе).

Хранение и упаковка. Посевную культуру хранят в лиофильно высушенном состоянии при температуре, обеспечивающей сохранение первоначальных биологических свойств на протяжении срока годности. На этикетку ампулы (флакона) с высушенным штаммом наносят следующие сведения: наименование и номер штамма, дата лиофилизации, порядковый номер лиофилизации, срок годности.

Посевную серию штамма контролируют не реже 1 раза в год по основным показателям качества, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Раздел 1. Изучение морфологических, тинкториальных и культуральных свойств пробиотических штаммов

1.1 Изучение морфологии и тинкториальных свойств культур

1.1.1. Микроскопия живых бактерий

Микроскопический метод исследования предусматривает наблюдение за живыми и убитыми микробами в окрашенном и неокрашенном (нативном) состоянии (метод «раздавленной» и «висячей» капли).

1.1.2. Окрашивание бактерий

На обезжиренном предметном стекле готовят мазок из микробной культуры, сушат и фиксируют его над пламенем горелки или химическим способом в смеси Никифорова. Затем окрашивают с помощью готовых наборов красителей или тест-систем, разрешенных к использованию, выбирая наиболее адекватный метод в зависимости от вида изучаемых микроорганизмов (по Граму – для выявления грамотрицательных и грамположительных бактерий; по методу Циля–Нильсена – для окрашивания кислотоустойчивых бактерий и обнаружения спор (в некоторых случаях); по способу Бурри или Бурри–Гинса – для выявления наличия капсул; по способу Ожешко (Ауески) или Пешкова – для выявления спор; по методу Нейссера – для выявления зерен воллутина; по Романовскому–Гимзе – для

изучения структуры протоплазмы и ядра клеток эукариотов при необходимости).

1.2 Изучение культуральных свойств штамма

Культуральные свойства характерны для каждого вида бактерий, поэтому являются важным дифференцирующим признаком. Культуральные признаки микроорганизмов определяют характером их роста на плотных, жидких и полужидких питательных средах различного назначения. Посев культур на плотные питательные среды проводят с применением методов, позволяющих получить изолированные колонии.

В паспорте на штамм следует описать размер, форму колоний, характер контура края, рельеф и поверхность колонии, цвет, структуру и консистенцию колонии. Подробно описать характер роста культуры на жидких и полужидких средах. Характеристика культуральных свойств включает также учет особенностей культивирования – температурные границы роста, газовый состав атмосферы, влажность атмосферного воздуха, освещенность, время экспозиции и др. Рост культуры следует изучать при минимальной, оптимальной и максимальной температуре роста, при выращивании в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях.

При правильном отборе и поддержании штамма культуры должны сохранять однородность по морфологическим и культуральным свойствам и не проявлять признаков диссоциации клеток и колоний. Не допускается присутствие среди исследуемых штаммов других микроорганизмов, отличающихся по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам от клеток и колоний предлагаемого производственного штамма

1.3 Изучение физиолого-биохимических свойств штамма

1.3.1 Сахаролитические свойства бактерий

Изучение способности бактерий ферментировать углеводы используется для идентификации и дифференциальной диагностики микроорганизмов. Сахаролитическую активность предлагаемого штамма

изучают с помощью зарегистрированных диагностических тест-систем для идентификации бактерий.

Предлагаемый производственный штамм должен полностью соответствовать по этим свойствам типовым штаммам видовой принадлежности согласно современной классификации Определителя бактерий Берджи. Штаммы с неясной характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных.

1.3.2 Протеолитические свойства бактерий

В процессе культивирования микроорганизмы выделяют во внешнюю среду различные протеолитические ферменты, которые можно разделить условно на 2 группы. В первую группу следует включить ферменты, относящиеся к факторам патогенности (например, гиалуронидаза, фибринолизин, плазмокоагулаза, гемолизин, лецитиназа С, лизоцим, нейраминидаза). Во вторую группу следует отнести ферменты, принимающие участие в обмене веществ микроорганизмов (дыхании и питании). Они расщепляют белки, пептиды, аминокислоты, в результате чего образуются легкоусвояемые микроорганизмами продукты питания и продукты метаболизма – кислоты, перекиси, индол, сероводород и др.

Для оценки протеолитических свойств первой и второй групп чаще всего используются нижеприведенные методы.

2.1 Ферменты, относящиеся к факторам патогенности

2.1.1 Тест на каталазную активность

Каталазная активность свойственна большинству патогенных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют.

Известно, что отсутствие способности образовывать каталазу является характерным признаком молочнокислых бактерий. Однако у некоторых лактобактерий рядом авторов обнаружена каталазная активность в присутствии определенных субстратов или благодаря наличию у них так называемой псевдокаталазной активности. Псевдокаталаза обнаружена у

штаммов *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* при выращивании их на питательном агаре с низким содержанием (до 0,05 %) глюкозы. Собственно каталаза проявляет свою активность на средах с гретой кровью или гематином, тогда как псевдокаталаза – на средах с низкой концентрацией глюкозы (например, на среде Фелтона, содержащей 0,05 % глюкозы). Эти ферменты не образуются при выращивании микроорганизмов на агаре с 1 % глюкозы без добавления гематина или гретой крови. В свою очередь, на активность каталазы не влияет присутствие в среде 2 % глюкозы, а также снижение pH среды с 7,0 до 4,5. Поэтому выявление продукции каталазы и псевдокаталазы осуществляют на следующих средах: основная среда, гематиновый агар, основная среда с 0,05 % глюкозы, основная среда с 1 % глюкозы. Основную среду и гематиновый агар разливают в чашки Петри, основные среды с 0,05 и 1 % глюкозы скашивают в пробирках. Посев испытуемых кисломолочных культур и тест-культуры (каталазо-положительной) осуществляют так, чтобы получить рост отдельных колоний.

Для выявления каталазной активности наносят каплю 10 % раствора водорода пероксида на колонию или приливают к суспензии клеток. Выделение кислорода, хорошо заметное по образованию пузырьков газа, свидетельствует о продукции каталазы исследуемым штаммом.

Положительный контроль – тест-штамм: *S. aureus* ATCC 6538-P.

Отрицательный контроль – тест-штамм: *E. faecalis* CCM 4224.

Предлагаемый производственный штамм должен быть каталазо-отрицательным.

Для выявления псевдокаталазы используют среду Фелтона (Felton, et al., 1958).

Примечания.

1. Приготовление основной среды. Мясной экстракт – 0,5 г; пептон – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; твин-80 – 0,05 мл; марганца сульфата тетрагидрат – 0,01 г; глюкоза – 1 г; агар микробиологический – 1,5 г; вода очищенная – до 100 мл; pH среды 6,8 – 7,0. Стерилизацию проводят при

температуре 121 °С в течение 15 мин. К 95 мл расплавленной основной среды добавляют 5 мл смеси (1:1) дефибринированной бычьей крови и воды, после чего её прогревают при температуре 100 °С в течение 15 мин для разрушения каталазы крови.

2. Приготовление гематинового агара. Пропись среды аналогична прописи основной среды. Вместо крови добавляют гематин в количестве 50 мкг/мл из основного раствора. Его готовят внесением 50 мг гематина в 10 мл воды очищенной, после чего добавляют 0,1 М раствор натрия гидроксида в объеме, необходимом для растворения гематина. После этого раствор прогревают при температуре 100 °С в течение 15 мин.

3. Приготовление среды Фелтона. Триптон – 1,0 г; глюкоза – 0,05 г; калия фосфат однозамещенный – 0,2 г; натрия хлорид – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; агар микробиологический – 1,5 г; вода очищенная – до объема 100 мл; pH 6,8 – 7,0. Среду стерилизуют, разливают в чашки Петри. На этой среде исследуется способность бактерий разлагать водорода пероксид в присутствии незначительных концентраций глюкозы.

2.1.2 Тест на продукцию лецитиназы

Некоторые патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов могут продуцировать лецитиназу С (лецитовителлазу), вызывающую деполимеризацию мембран клеток хозяина. Ее наличие определяют по способности бактерий разрушать лецитин, входящий в состав желтка куриного яйца.

В пробирку с бульоном, содержащим желток куриного яйца, вносят 1 петлю суточной культуры, выращенной на плотной питательной среде, и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По истечении срока инкубации регистрируют наличие беловатой мути и всплывающих хлопьев, свидетельствующих о продукции микроорганизмом лецитиназы.

Положительный контроль – *S. aureus* 6538-Р ATCC; *S. aureus* «Жаев», *S. aureus* «Виотко».

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* 14990 ATCC.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать лецитиназу.

Примечания.

1. Приготовление бульона с яичным желтком. Один свежий яичный желток асептически вносят в 400 мл стерильного мясопептонного бульона (МПБ), хорошо перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 4 – 5 мл и выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч для проверки на стерильность (среда в пробирках не должна мутнеть).

2. Приготовление плотной среды для выявления летициназы. Среда предназначена для выявления фермента у стафилококков, иерсиний и некоторых анаэробов.

Состав среды:

• Гидролизат казеина панкреатический	40,0 г
• Натрия гидроортофосфат	5,0 г
• Калия гидроортофосфат	1,0 г
• Натрия хлорид	2,0 г
• Магния сульфат гептагидрат	0,1 г
• Глюкоза	2,0 г
• Агар микробиологический	25,0 г
Вода очищенная	до 1000 мл

Ингредиенты смешивают, растворяют при нагревании в 1000 мл воды. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 мин. Основа среды бледно-желтого цвета. К охлажденной до температуры $50\text{--}55^\circ\text{C}$ основе добавляют 2 желтка куриного яйца (1 желток на 500 мл среды). Перед использованием яйца тщательно моют в теплой воде, выдерживают 1 ч в 96 % спирте этиловом. Готовую среду разливают в чашки Петри.

3. Приготовление желточно-солевого агара. Среда предназначена для выявления фермента лецитиназы у стафилококков.

Состав среды:

• Мясопептонный агар(МПА)	1000 мл
• Натрия хлорид	90,0 г
• Желточная взвесь (1 желток на 200 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида)	150,0 мл

К охлажденной до температуры $50\text{--}55^\circ\text{C}$ основе (солевому агару) добавляют 150 мл желточной взвеси. Готовую среду разливают в чашки Петри.

2.1.3 Определение плазмокоагуляционной активности

Некоторые патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов могут продуцировать плазмокоагулазу, которую можно выявить в тестах *in vitro* с помощью цитратной кроличьей плазмы, сыворотки крови кролика, взятой из сердца, или на специальных питательных средах, в которые добавлена плазма.

Перед исследованием сухую кроличью цитратную плазму разводят 1:5 стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, затем 0,5 мл разведенной плазмы вносят в стерильную пробирку и в ней суспендируют одну петлю 18 – 20-часовой агаровой культуры испытуемого микроорганизма. Пробирки помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и через 1; 2; 3; 18 и 24 ч проверяют наличие сгустка в пробирке вследствие свертывания плазмы. Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы. В качестве контроля ставят реакцию с коагулазо-положительным и коагулазо-отрицательным стафилококками, обладающим и не обладающим плазмокоагулазой соответственно.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать плазмокоагулазу.

2.1.4 Определение фибринолитических свойств

Методика исследования основана на способности микроорганизмов, обладающих фибринолизинем, вызывать растворение сгустка плазмы крови.

В стерильные пробирки вносят 0,1 мл цитратной кроличьей плазмы, 0,4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 0,25 мл 18 – 20-часовой бульонной культуры испытуемого штамма и 0,25 мл 0,25 % раствора кальция хлорида. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Если в пробирке после 15 – 20 мин инкубации образуется сгусток (так же, как и в контрольной пробирке, в которую вместо бульонной культуры добавляют стерильную питательную среду), и через 2 ч инкубации не отмечается его разжижение, то считают, что испытуемая культура не обладает фибринолитическими свойствами. Если в пробирке не образуется сгусток, или происходит его разжижение после 2 ч инкубирования в указанных условиях, культура характеризуется наличием фибринолизина.

Положительный контроль – *S. pyogenes* «Гуров».

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990; *S. saprophyticus* 15305.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать фибринолизин.

2.1.5 Тест на лизоцим (мурамидазу)

Лизоцимную активность штамма определяют методом, который основан на способности лизоцима расщеплять β -(1-4)-гликозидные связи мукополисахаридного комплекса клеточной стенки эталонного тест-штамма *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*).

Готовят плотную среду, содержащую инактивированную культуру *M. luteus* NCTC 2665. Для этого предварительно чистую культуру *M. luteus* выращивают в течение 16 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на чашках Петри с МПА. Выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида (3 мл на 1 чашку), автоклавируют 15 мин при температуре 120°C и хранят при температуре от 2 до 8°C . В стерильные чашки вносят расплавленную плотную питательную среду, содержащую автоклавированную суспензию микрококка в концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл по стандартному образцу (СО) мутности.

Испытуемые пробиотические штаммы выращивают в жидкой (или плотной) питательной среде, используемой для их культивирования. Культуру второго пассажа засевают по одной посевной петле (диаметром 2–3 мм) бляшками на подготовленную подсушенную плотную среду, содержащую убитую культуру микрококка. На 1 чашку наносят не более 5 штаммов на равном расстоянии друг от друга и от краев чашки, посевы инкубируют в течение 2–4 сут при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от вида испытуемого штамма и регистрируют зону лизиса микрококка вокруг выросших колоний испытуемых штаммов.

О степени лизоцимной активности судят по ширине зоны просветления: низкая – 1 – 3 мм, средняя – 4 – 7 мм, 8 мм и более – высокая.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P и *S. pyogenes* Dick I.

Перед проведением испытания целесообразно проверить тест-штамм *M. luteus* на лизируемость лизоцимом. Для этого, используя отраслевой стандарт мутности, готовят микробную взвесь с содержанием 10^9 микробных клеток в 1 мл и разливают ее в 2 пробирки по 1 мл. В одну (опытную) пробирку добавляют 8 мкг лизоцима, растворенного в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, создавая конечную концентрацию фермента 4 мкг/мл. Во вторую (контрольную) пробирку прибавляют 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Культура считается пригодной для работы, если за этот период в опытной пробирке произойдет полный лизис клеток микрококка, что определяют по степени прозрачности содержимого пробирки.

Примечание.

Некоторые виды бактерий нормальной микрофлоры (например, *Lactobacillus fermentum*) при отсутствии других факторов патогенности продуцируют лизоцим, что считается положительным свойством этих бактерий, т.к. определяет его антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

2.1.6 Тест на гемолизин

Некоторые бактерии продуцируют такие факторы патогенности, как гемолизины – вещества, разрушающие эритроциты. В связи с этим продукция гемолизина во многих случаях является маркером вирулентности микроорганизма.

На кровяном агаре колонии гемолизующих бактерий окружены зонами просветления (гемолиза). Для адекватного определения гемолитической активности следует просматривать чашки с посевами против источника света, т.к. способность образовывать гемолизины (и, соответственно, размеры зон гемолиза) может быть вариабельной. Активность гемолизинов может проявляться в полном или неполном разрушении эритроцитов. Виды гемолиза подразделяют на альфа-, бета- и гамма-гемолиз.

А. Альфа-гемолиз – неполное разрушение эритроцитов с сохранением клеточной стромы. Просветление среды вокруг колоний обычно незначительно; среда вокруг колоний может приобретать зеленовато-коричневую окраску вследствие образования метгемоглобина.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P; *S. aureus* 0-15.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Б. Бета-гемолиз – полное разрушение эритроцитов с ферментативным обесцвечиванием гемоглобина. Колонии бактерий окружены прозрачными зонами гемолиза различного размера.

Положительный контроль – *S. aureus* «Лепин»; *S. aureus* 5.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

В. Гамма-гемолиз – эритроциты остаются без изменения. Гемолитические свойства микробов проявляются по-разному на средах с дефибринированной кровью человека, барана, кролика или морской свинки.

Положительный контроль – *S. aureus* «Лепин»; *S. aureus* 5.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Для получения изолированных колоний делают посев штрихом 18-часовой исследуемой культуры. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 – 48 ч, после чего проводят учет результатов.

Для предохранения гемолизинов от разрушения кислородом посев культуры штрихом можно вначале произвести на питательный агар без крови. Затем на первый слой налить 10 мл расплавленного и остуженного до температуры 48 – 50 °C питательного агара с добавлением 5 % крови. Вокруг погруженных в агар колоний гемолиз проявляется более четко. В некоторых случаях гемолиз лучше выявляется, если после 24 – 48 ч инкубации чашек в термостате их помещают на 18 – 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °C.

При проведении реакции необходимо учитывать возможное воздействие на эритроциты образующихся в процессе жизнедеятельности ряда бактерий органических кислот (молочной, муравьиной, уксусной и др.),

которые могут вызывать изменения гемоглобина, сходные с гемолизом, т.е. давать ложноположительную реакцию гемолиза. Поэтому следует представить фактические данные, подтверждающие, что данный штамм не продуцирует гемолизины (отсутствие плазмид или участка гена, кодирующих синтез гемолизина).

Предлагаемые производственные штаммы не должны обладать гемолитической активностью.

Примечание.

Приготовление 5 % кровяного агара. К 100 мл растопленного и остуженного до температуры 45–50 °С МПА с 2 % агара микробиологического в его составе (рН 7,4–7,6), соблюдая правила асептики, добавляют 5мл стерильной дефибринированной крови кролика, лошади, барана или человека, не содержащей консервантов или антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, остерегаясь образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно подогретые в термостате.

Перед розливом чашки устанавливают на ровную поверхность. Слой агара должен быть одинаковым по всей площади чашки и толщиной не более 3 мм.

2.1.7 Определение гиалуронидазы

Некоторые бактерии образуют гиалуронидазу – фермент, разрушающий гиалуроновую кислоту. Сущность метода состоит в том, что культуральную жидкость, полученную после выращивания испытуемого микроорганизма, смешивают с красителем трипановым синим и вводят внутрикожно животным. Наличие гиалуронидазы определяют путем сравнения площади распространения красителя, введенного в смеси с фильтратом культуральной среды и без нее.

В ходе испытания исследуемый штамм выращивают в селективной жидкой среде в оптимальных для него условиях (температуре и времени экспозиции). По окончании инкубации культуру сначала центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30 мин, при необходимости – фильтруют через бактериальные фильтры. Животным – кроликам или морским свинкам – вводят смесь, состоящую из 0,1 мл испытуемого фильтрата и 0,1 мл 10 %

раствора трипанового синего. Результаты учитывают по отношению площади распространения краски в опыте и контроле, определяя индекс диффузии.

Для исключения влияния местного воспаления на распространение краски опыты ставят не только на коже живого кролика (морской свинки), но и на снятой (предварительно депилированной) коже.

Предлагаемый пробиотический штамм не должен продуцировать гиалуронидазу.

3. Ферменты, участвующие в обмене веществ

3.1. Тест на продукцию желатиназы

Метод 1. К питательной среде добавляют желатин (из расчета 10 – 15 г на 100 мл), разливают в пробирки высоким столбиком. Посев испытуемого штамма осуществляют уколом, погружая петлю с культурой вглубь питательной среды. Засеянную культуру инкубируют в термостате при оптимальной для нее температуре в течение 1 – 2 сут. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят 2 пробирки с незасеянной желатиновой средой для контроля. При регистрации результатов учитывают интенсивность роста микроорганизма и характер (форму) разжижения среды с желатином.

Метод 2. О продукции желатиназы судят по обесцвечиванию полоски фото пленки, помещенной в пробирку с исследуемой культурой.

Полоски фото пленки размером 25 × 3 мм, освещенной и проявленной, прокладывают кусками фильтровальной бумаги, помещают в чашку Петри и автоклавируют при температуре 110 °С (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Исследуемую культуру бактерий засевают в пробирки с МПБ, под пробку пробирки вставляют полоску стерильной фото пленки так, чтобы верхняя часть ее оставалась не погруженной в среду. Посевы инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Если культура разжижает желатин, погруженная часть пленки становится прозрачной, а черная пыль редуцированного серебра выпадает на дно пробирки. Большинство бактерий,

продуцирующих желатиназу, обесцвечивают полоску в течение 1сут. При отрицательных результатах посева оставляют в термостате до 7 сут.

Положительный контроль – *Proteus mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24a; *Morganella morganii* 417.

Отрицательный контроль – *Yersinia enterocolitica* № 134.

Предлагаемый производственный штамм не должен разжижать желатин.

Примечание.

Приготовление желатиновой питательной среды. Среда предназначена для определения желатиназы.

Состав среды:

- Бульон Хоттингера 1000 мл
- Желатин пищевой высшего сорта 100,0 г

Желатин вносят в бульон для набухания на 1,5 – 2 ч, нагревают на водяной бане при 40 – 50 °С до полного расплавления. Устанавливают pH 7,2. При необходимости среду фильтруют или осветляют с помощью суспензии куриных яиц (2 яйца, размешанных в двойном объеме холодной воды очищенной, вносят в среду, нагревают до свертывания белка, затем снова фильтруют). Разливают в пробирки по 8 – 9 мл. Стерилизуют при температуре 112 °С в течение 30 мин. Готовая среда имеет желтовато-коричневый цвет.

3.2. Тест на продукцию протеазы

У некоторых видов патогенных бактерий продукция протеазы является одним из факторов патогенности.

О продукции протеазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем казеин. Испытуемую культуру засевают штрихом в чашки с казеиновым агаром и инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С в течение 18 ч. По окончании инкубации в чашки наливают 5 мл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и наблюдают в течение 3 мин за появлением прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Положительный контроль – *V.cholerae* не-01 № P-9741.

Предлагаемый производственный штамм не должен обладать протеазой.

Примечание.

Приготовление агара с казеином. Готовят 2 % раствор казеина на 0,1 М буферном растворе трис-гидрохлорида (рН 7,0 – 8,0). Раствор подогревают до температуры $(55 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ и смешивают в равных объемах с раствором 2 % агара Дифко, охлажденного до той же температуры. Полученный казеиновый агар разливают в чашки Петри с соблюдением условий асептики.

3.3 Тест на продукцию амилазы

О продукции амилазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза крахмала вокруг посевов в картофельном агаре.

Испытуемый штамм засевают штрихом, инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. По окончании инкубирования выросшую культуру в чашках заливают 5 мл раствора Люголя и в течение 5 мин наблюдают за появлением прозрачных светло-коричневых зон вокруг посевов.

Примечание.

Приготовление картофельного агара. Очищенный от кожуры сырой картофель промывают, нарезают ломтиками, заливают водой из расчета 130 г на 1 л воды очищенной, кипятят 30 мин, фильтруют и к фильтрату добавляют 20 г агара микробиологического и 2 г натрия хлорида. Нагревают, помешивая стеклянной палочкой, до полного расплавления агара, если необходимо, снова фильтруют, разливают во пробирки по 10 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве 30 мин при температуре $110 ^\circ\text{C}$ (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Готовый картофельный агар разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

3.4. Тест на продукцию липазы

О продукции липазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем твин-20.

Культуру, выращенную на МПБ при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч, высевает штрихом на агаризованную среду с твином-20 и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. По истечении срока инкубации регистрируют появление или отсутствие прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Примечание.

Приготовление агара с твином-20. Готовят 2 % агар на 0,06 М фосфатном буфере (рН 7,4 – 7,6). Твин-20 нагревают на водяной бане до температуры $(55 \pm 5) ^\circ\text{C}$ и вносят в расплавленный агар до конечной концентрации 1 %. Быстро перемешивают встряхиванием и добавляют 10 % раствор кальция хлорида до конечной концентрации 0,1 %. Тщательно перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют на кипящей водяной бане в течение 40 мин. После стерилизации разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

3.5 Тест на продукцию аргининдегидрогеназы

Продукцию аргининдегидрогеназы изучают на среде Шеррис. Пробирку со средой Шеррис и контрольную (без аргинина) засевают 18-часовой культурой испытуемого штамма и заливают стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 сут. О разложении аргинина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

Положительный контроль – *S. aureus* 6538-Р ATCC.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134.

3.6 Тест на редукцию нитратов

Восстановление нитратов до нитритов осуществляют микроорганизмы, имеющие нитратредуктазу, и использующие нитраты как источник азота. Тест предназначен для идентификации энтеробактерий и некоторых других микроорганизмов.

Редукцию нитратов определяют путем культивирования бактерий на МПБ с 0,2 % раствором KNO_3 при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 7–10 сут, начиная наблюдение за результатами после 24 ч инкубирования. Образование нитритов определяют по крахмально-йодной пробе или с реактивом Грисса.

В первом случае для выявления нитритов к 1 капле раствора, содержащего калий йодистый, крахмал и цинка(II) хлорид, добавляют по 1 капле исследуемой культуры микроорганизмов и раствора

хлористоводородной кислоты. При наличии в среде нитритов наблюдается синее окрашивание.

При выявлении нитритов вторым способом к капле испытуемой культуры добавляют 1 каплю реактива Грисса. Вследствие образования нитритов выявляется красно-розовое окрашивание.

Положительный контроль – *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*.

Отрицательный контроль – *Micrococcus luteus*.

Примечание.

1. Приготовление среды для теста на нитрат-редуктазу.
Питательная среда предназначена для определения способности бактерий редуцировать нитраты до нитритов.

Состав:

- Пептон 5,0 г
- KNO_3 (свободный от KNO_2) 0,2 г
- Вода очищенная 1000 мл

Ингредиенты растворяют в 1000 мл воды очищенной, подогревают, устанавливают pH 7,4, разливают в пробирки по 5,0 мл. Стерилизуют при 121°C в течение 15 мин.

2. Приготовление реактива Грисса.

Состав:

Раствор 1.

- Сульфаниловая кислота 8,0 г
- Уксусная кислота (5 N раствор) 1000 мл

Раствор 2.

- Альфа-нафтиламин 5,0 г
- Диметил-альфа-нафтиламин 6,0 г
- Уксусная кислота (5 N раствор) 1000 мл

Реактивы готовят при слабом нагревании с особой осторожностью из-за их токсичности. Хранят при $(6 \pm 4)^\circ\text{C}$ в герметично закупоренных емкостях из темного стекла. Срок годности 2–3 мес.

3.7 Реакция Фогеса–Проскауэра

Некоторые микроорганизмы при сбраживании глюкозы способны образовывать ацетон (ацетилметилкарбинол), который выявляют в реакции Фогеса–Проскауэра.

Для постановки реакции Фогеса–Проскауэра культуру выращивают на среде Кларка при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–72 ч. Затем к 1 мл микробной культуры добавляют 0,6 мл альфа-нафтола (5 % раствор в

этиловом спирте) и 0,2 мл 40 % раствора калия гидроксида и взбалтывают. При положительной реакции наблюдается вишнево-красное окрашивание.

Положительный контроль – *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*.

Отрицательный контроль – *Escherichia coli*.

Примечание.

1. Приготовление среды Кларка для реакции Фогеса-Проскауэра.

Состав:

- Пептон 0,5 г
- Калия гидроортофосфат 0,5 г
- Глюкоза 0,5 г
- Вода очищенная 80 мл

Перечисленные ингредиенты размешивают при подогревании в течение 20 мин. Фильтруют через бумажный фильтр, охлаждают до температуры 20 °С и доводят объем до 100 мл водой очищенной. Разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют 3 дня текучим паром по 30 мин.

2. Приготовление реактива к реакции Фогеса-Проскауэра

Реактив 1. Навеску 5 г альфа-нафтола растворяют в 100 мл 96 % спирта этилового.

Реактив 2. Навеску 40 г калия гидроксида растворяют в 100 мл воды очищенной.

3.8 Тест на гидролиз мочевины (тест на уреазу)

Тест на уреазу предназначен для дифференциальной диагностики некоторых микроорганизмов и заключается в способности некоторых бактерий гидролизовать мочевины с образованием аммиака и углекислоты. Это приводит к изменению pH среды до щелочных показателей. О наличии уреазы у бактерий судят по покраснению среды, содержащей мочевины.

Готовят бульон с мочевиной: к 100 мл стерильного МПБ (pH 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл фенолового красного (1,6 % спиртовой раствор). Разливают по 2 – 3 мл в стерильные пробирки, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

В пробирку с бульоном, содержащим мочевины, вносят 1 петлю суточной культуры, выращенной на МПА, инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Изменение окраски среды с желтой до

розово-красной свидетельствует о наличии фермента уреазы и способности испытуемой культуры гидролизовать мочевины.

Положительный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

Отрицательный контроль – *L. monocytogenes* 766, *E.coli*.

3.9 Тест на расщепление тирозина

О разложении тирозина судят по исчезновению кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Готовят агар с тирозином: 0,5 г L-тирозина суспендируют в 10 мл воды дистиллированной, помещают в пробирку, укупоривают ватно-марлевой пробкой и автоклавируют при температуре 110 °C (1,5 атм) в течение 30 мин. Охлажденный до температуры (50 ± 5) °C раствор тирозина в стерильных условиях смешивают с 100 мл расплавленного стерильного МПА и разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

После застывания агара культуру высевает на чашки штрихом и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °C в течение 24 ч. Наблюдают за исчезновением кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Положительный контроль – *P. mirabilis* 3177.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

3.10 Тест на утилизацию цитрата

Тест на утилизацию цитрата используют при дифференциальной диагностике энтеробактерий и близкородственных им микроорганизмов. Для изучения способности бактерий использовать цитрат в своем метаболизме обычно применяют цитратный агар Симмонса или Кристенсена, а также жидкую среду Козера.

Положительный контроль – *P. mirabilis* 3177.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

3.11 Тест на образование аммиака, индола, сероводорода

Многие бактерии обладают протеолитической активностью, о чем можно судить по их способности образовывать аммиак, индол или сероводород в качестве продуктов протеолиза при росте на соответствующих питательных средах. Об образовании этих веществ судят по изменению цвета индикаторов.

Для обнаружения аммиака можно использовать лакмусовую бумагу (индикаторная бумага синееет). Для выявления индолообразования применяют реактивы Эрлиха или Ковача, которые дают сиреневое или малиновое окрашивание при положительном тесте на индол. А для определения способности бактерий образовывать сероводород в качестве индикатора используют раствор свинца уксуснокислого (наблюдается почернение индикаторной полоски).

Кроме того, разработаны коммерческие питательные среды, содержащие индикаторы для выявления продуктов протеолиза бактерий.

3.12 Скваживающая способность пробиотического штамма

Односуточную культуру исследуемого штамма засевают в стерильное молоко из расчета 3–5 % посевного материала к объему молока. Пробирки с посевным материалом и со стерильным молоком без культуры (контроль) помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре в течение 2–3 сут. При регистрации результатов учитывают способность культуры сквашивать молоко и образовывать сгусток. Кислотность определяют титриметрическим способом.

Данный метод рекомендован в качестве ориентировочного теста. Ряд штаммов кисломолочных культур могут не сквашивать молоко с образованием сгустков, но продуцируют вещества, изменяющие кислотность питательной среды. Поэтому следует определять активность кислотообразования, показатель которой выражается в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$), по методу, описанному в ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

4. Определение антагонистической активности пробиотических штаммов

Определение антагонистической активности испытуемых производственных пробиотических штаммов проводят методом отсроченного антагонизма в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

5. Определение чувствительности пробиотических штаммов к антибиотикам

Чувствительность производственных пробиотических штаммов к антибиотикам определяют в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Исследованию по оценке антибиотикочувствительности подлежат чистые культуры испытуемых микроорганизмов, принадлежность которых к определенному виду подтверждена фено- и генотипическими методами исследования.

6. Определение устойчивости производственного пробиотического штамма к действию желудочного сока и желчи

Производственные штаммы должны быть устойчивы к действию желудочного сока, желчи, повышенному содержанию соли и щелочи при прохождении через желудочно-кишечный тракт для сохранения жизнеспособности культур, вошедших в состав пробиотиков. Если эти свойства у рекомендуемого штамма не обнаружены или снижены, а культура характеризуется продукцией уникальных биологически активных веществ, обладающих терапевтическим действием, следует провести исследования для подбора вспомогательных веществ или лекарственной формы (например, кислотоустойчивые капсулы, таблетки с защитным покрытием и др.), обеспечивающих максимальное сохранение жизнеспособности пробиотических культур.

Способ 1. В пробирку, содержащую 9,0 мл желчи медицинской консервированной, засевают 1 мл испытуемой культуры с концентрацией 10^8

– 10^9 оптических единиц мутности. Культуры инкубируют в термостате при температуре 37–38 °С в течение 24 – 72 ч в зависимости от вида микроорганизма. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности, а также выборочно контролируют путем световой микроскопии препаратов, приготовленных из испытуемой культуры по окончании инкубации в присутствии желчи.

Способ 2. Исследуемый штамм засевают на стерильный лист целлофана, помещенного на адекватную агаризованную среду, и инкубируют при температуре 37 °С в течение 16– 18 ч. После этого выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида в фосфатном буферном растворе (ЗФР) и доводят микробную концентрацию до 10^9 КОЕ/мл (по оптическому стандарту мутности). В пробирку с 1 мл бактериальной суспензии добавляют 9,0 мл биологической жидкости (желчь медицинская консервированная, желудочный сок «Эквин»). В контрольную пробирку к взвеси испытуемого штамма добавляют 9,0 мл ЗФР. Пробирки выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч, затем определяют количество жизнеспособных клеток методом серийных разведений с последующим высевом на адекватную плотную питательную среду.

7. Тест на устойчивость производственного пробиотического штамма к щелочной реакции среды

В жидкую питательную среду, подходящую для культивирования исследуемого штамма (рН от 8,0 до 9,6), засевают испытуемую пробиотическую культуру (по 1 петле на 8 – 10 мл среды). Посевы выдерживают в термостате при оптимальной для штамма температуре в течение 24 – 48 ч.

Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию помутнения среды.

8. Тест на устойчивость производственного пробиотического штамма к повышенным концентрациям солей

В жидкую питательную среду, используемую для культивирования испытуемого штамма, содержащую 2,4 и 6,5 % натрия хлорида (рН 6,8 – 7,0), засевают исследуемую пробиотическую культуру (по 1 петле на 10 мл среды) и выдерживают в термостате при оптимальной для штамма температуре в течение 48 ч.

Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию помутнения, а также выборочно контролируют путем микроскопии препаратов, приготовленных из культуральной среды по окончании инкубирования посевов.

9. Определение продукции бактериоцинов производственным пробиотическим штаммом

На чашках с 1,5 % питательным агаром *Difco* размечают точки, соответствующие количеству штаммов, и помещают на размеченные участки по 2–5 мкл суспензии 12-часовой культуры испытуемых микроорганизмов. Количество чашек должно соответствовать количеству тест-культур с учётом контрольных чашек. Чашки инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 4–12 ч. Продукцию бактериоцина испытуемым штаммом инициируют УФ-облучением в течение 30 с, затем культуру инкубируют в тех же условиях еще 3–2 ч. После культивирования в течение 48 ч проводят инактивацию культур хлороформом следующим образом: чашку Петри переворачивают вверх дном, снимают крышку, поднимая чашку со средой, и кладут в крышку фильтровальную бумагу, смоченную 300 мкл хлороформа. После экспозиции в течение 30 мин заменяют крышки с хлороформом на чистые и стерильные, а инаktivированные посевы проветривают около 15 мин. После этого на уже имеющийся слой агара наслаивают 3–5 мл 0,7 % агара, содержащего 10^7 КОЕ/мл тест-штамма. Инкубируют в течение 12–16 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

После инкубации регистрируют наличие зон просветления в слое тест-культуры вокруг пятен исследуемых штаммов. Таким способом можно одновременно оценить способность исследуемого штамма продуцировать

бактериоцины, а также определить чувствительность штамма к бактериоцинам, продуцируемым другими микроорганизмами.

10. Определение наличия фагов у производственных штаммов, используемых для изготовления пробиотиков для медицинского применения

Определение наличия фагов в геноме производственного штамма проводят путем посева взвеси испытуемой культуры второго или третьего пассажа на соответствующую плотную питательную среду в объеме не более 1 мл (концентрация 10^7 – 10^9 микробных клеток в 1 мл). Перед посевом чашки Петри с питательной средой подсушивают в термостате для удаления конденсата. Микробную взвесь равномерно распределяют по поверхности среды путем покачивания чашек, чтобы получить сплошной газон. Остатки взвеси отсасывают стерильной пастеровской пипеткой. Затем чашки помещают в термостат при температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Через 19–36 ч учитывают результат посева. На сплошном росте посеянной культуры не должно быть зон фаголизиса.

Раздел 2. Требования к тест-штаммам, используемым для определения антагонистической активности производственных штаммов, посевных культур и готовых лекарственных форм пробиотиков

Исследование по изучению антагонистической активности осуществляют в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков»; набор тест-штаммов указывается в фармакопейной статье. Величина зоны угнетения роста изучаемых штаммов относительно друг друга не должна быть более 10 мм.

Пробиотические штаммы должны проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно патогенных микроорганизмов и не должны угнетать рост представителей нормофлоры. Перечень тест-штаммов для контроля антагонистической активности определяют на основании результатов клинических (лечебное действие) и

микробиологических (влияния на определенную группу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов) испытаний эффективности и безопасности конкретных групп препаратов. Рекомендуемые тест-штаммы должны быть идентифицированы до вида по фено- и генотипическим признакам, должны быть однородны по морфологическим, тинкториальным, культуральным, физиолого-биохимическим свойствам и охарактеризованы по вирулентным свойствам и токсичности.

Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника, даты выделения и характеристики их биологических свойств.

Тест-штаммы должны соответствовать требованиям по следующим показателям.

Подлинность. Подлинность каждого тест-штамма определяется микробиологическими методами. Культуры должны обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными и физиолого-биохимическими свойствами без признаков диссоциации.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Хранение и упаковка. Тест-штаммы хранят в лиофильно высушенном состоянии при температуре, обеспечивающей сохранение первоначальных биологических свойств на протяжении срока годности в помещениях, изолированных от производственных площадей. На ампуле (флаконе) с лиофильно высушенным штаммом указывают следующие сведения: наименование и номер штамма, дату лиофилизации, порядковый номер лиофилизации, срок годности.

Тест-штаммы контролируют ежегодно по всем биологическим свойствам, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Раздел 3. Исследование адгезивной активности пробиотических штаммов

Адгезивная активность пробиотических штаммов определяет их способность прикрепиться к эпителию кишечника и размножиться прежде, чем клетки слизистого слоя будут обновлены.

Для обеспечения данной функции бактерии имеют ряд структур (пили/фимбрии, компоненты клеточной стенки), посредством которых происходит их прикрепление к эпителиальной клетке. Эти структуры называются факторами адгезии и колонизации и относятся к факторам патогенности. Бактерии способны экспрессировать различные типы фимбрий, которые кодируются различными хромосомальными и плазмидными генами. Это генетическое разнообразие позволяет клеткам адаптироваться к изменяющейся окружающей среде и использовать эту возможность по отношению к различным поверхностным структурам хозяина.

Механизм специфической адгезии включает 2 фазы: обратимую и необратимую. Обратимая фаза может быть обеспечена гидрофобным взаимодействием, электростатическим притяжением, броуновским движением, а также атомными и молекулярными вибрациями. Необратимая специфическая фаза обеспечивается множеством связей типа «ключ-замок» между комплементарными молекулами на каждой из клеточных поверхностей; как только эти связи сформировались, прикрепление бактерий становится необратимым.

Определение способности пробиотических штаммов к адгезии является важным критерием их отбора для создания препаратов пробиотиков медицинского назначения.

Для исследования адгезии используют суточные культуры испытуемых штаммов.

Суточную чистую культуру исследуемого штамма, выращенную на скошенной адекватной питательной среде, смывают ЗФР, рН 7,2 и затем дважды отмывают ЗФР путем центрифугирования (1500 об/мин в течение 10 мин).

Испытуемые культуры можно также выращивать на плотной среде, покрытой целлофаном, при температуре 37 °С в течение 16–18 ч. После этого готовят суспензию, содержащую $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Подготовленные таким образом культуры, выращенные на целлофане, доводят до указанной концентрации без отмывания.

1. Метод определения адгезивности пробиотических штаммов к эритроцитам. Эритроциты дважды отмывают от консерванта в ЗФР путем центрифугирования (1000 об/мин в течение 10 мин) и доводят до нужной концентрации (10^8 клеток в 1 мл ЗФР). Подсчет концентрации эритроцитов производят в камере Горяева с помощью световой микроскопии по общепринятой методике.

Затем в пробирку с 0,5 мл взвеси микробов указанной выше концентрации вносят 0,5 мл суспензии эритроцитов и инкубируют 30 мин при температуре (37 ± 1) °С, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от неадгезированных микробов (при 600 об/мин по 10 мин).

После отмывки на предметном стекле готовят мазок, фиксируют смесью Никифорова, окрашивают по Романовскому–Гимзе и при микроскопировании проводят оценку уровня адгезии. Средний показатель адгезии (СПА) определяют по среднему числу микробов, прилипших к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов.

Степень адгезивности считают нулевой при СПА от 0 до 0,99; низкой – от 1,00 до 1,99; средней – от 2,00 до 3,99 и высокой $> 4,00$.

Из числа учитываемых эритроцитов подсчитывают процент эритроцитов ($K\%$), имеющих на своей поверхности прилипшие микробы.

Кроме того, подсчитывают индекс адгезивности микроба (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе, по формуле:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА } 100\%) / K,$$

где СПА – средний показатель адгезии испытуемого микроба;

K – количество эритроцитов, имеющих на своей поверхности прилипшие микробы.

Учет результатов. Микроорганизмы считают неадгезивными при ИАМ от 1,00 до 1,75; низкоадгезивными – ИАМ от 1,76 до 2,49; среднеадгезивными – ИАМ от 2,50 до 3,99 и высокоадгезивными – при ИАМ $> 4,00$.

2. *Метод определения адгезивности пробиотических штаммов к эпителиальным клеткам кишечника крыс или мышей.* Адгезивность штаммов изучают в системе *in vitro* на эпителиальных клетках тонкой и толстой кишки крыс линии Фишер или любой другой линии, или на беспородных белых мышах. Крыс или мышей умерщвляют углекислым газом. Из кишечника погибших животных выделяют кусочки размером 5×5 мм, тщательно отмывают их от слизи и содержимого с помощью ЗФР. После этого из кусочков слизистой кишечника на вибраторе модели ВПП получают эпителиальные клетки.

Полученные эпителиоциты дважды отмывают охлажденным ЗФР (рН 7,2) при центрифугировании (800 об/мин по 10 мин). После определения исходной концентрации клеток с помощью камеры Горяева при световой микроскопии ее доводят до $2 \cdot 10^6$ клеток/мл с помощью ЗФР. Одновременно с подготовкой клеток эпителия готовят суспензию испытуемой пробиотической культуры в концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

При проведении эксперимента на 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток наносят 0,5 мл взвеси бактериальной культуры указанной концентрации.

Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, периодически встряхивая. Затем смесь трехкратно отмывают ЗФР от неадгезированных микробов при центрифугировании (600 об/мин по 10 мин). Все манипуляции осуществляют на холоде. К полученному после отмывания осадку добавляют 1–2 капли ЗФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют 96° спиртом и окрашивают по Романовскому–Гимзе.

В световом микроскопе подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 энтероцитам или колоноцитам.

При оценке адгезивности каждого штамма микроорганизма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают СПА – число микробов, адгезированных к 1 клетке-энтероциту, подсчитывая среднее количество «микроб/клетка» в 10 полях зрения и учитывая результаты всех опытов (учитывается не менее 25 энтероцитов в 10 полях зрения).

Уровень адгезии отдельных штаммов бактерий условно разделен на 4 степени: неадгезивные штаммы (СПА = 0); слабоадгезивные (СПА = 1–5); среднеадгезивные (СПА = 5–10) и высокоадгезивные (СПА выше 10).

3. Определение уровня адгезивной активности штаммов-пробиотиков на модели эпителиальных клеток влагалища. Взятие материала для получения изолированных эпителиальных клеток производят при проведении диагностической гистероскопии и отдельном диагностическом выскабливании стенок шейки матки и цервикального канала при различных неинфекционных заболеваниях тела матки.

В асептических условиях под внутривенной анестезией шейка матки обнажается куско- или ложкаобразными зеркалами. После этого производят соскоб эпителия слизистой боковых стенок влагалища. После забора материал помещают в транспортный контейнер с жидкой питательной средой 199. Контейнер обкладывается льдом.

Полученные клетки дважды отмывают охлажденным ЗФР (pH 7,2) центрифугированием при 800 об/мин по 10 мин. После определения

исходной концентрации взвеси клеток с помощью камеры Горяева с помощью светового микроскопа суспензию клеток разводят до концентрации $(1,5-2) \cdot 10^6$ клеток/мл.

Далее готовят суспензию испытуемого штамма с концентрацией $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

В ходе испытания 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток смешивают с 0,5 мл взвеси бактериальной культуры указанной концентрации. Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают 3ФР от неприлипших микробов при 600 об/мин по 10 мин. Все манипуляции осуществляют на холоде. К осадку добавляют 1– капли 3ФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

В световом микроскопе подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 эпителиоцитам.

При оценке адгезивности каждого штамма микроорганизма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают СПА – число микробов, адгезированных к 1 клетке-эпителиоциту, подсчитывая среднее количество «микроб/клетка» в 10 полях зрения и учитывая результаты всех опытов (учитывается не менее 25 эпителиоцитов в 10 полях зрения).

Степень адгезии отдельных штаммов бактерий определяют следующим образом: неадгезивные штаммы (СПА = 0); слабоадгезивные (СПА = 1 – 5); среднеадгезивные (СПА = 5 – 10) и высокоадгезивные (СПА выше 10).

Штаммы с высокой адгезивной активностью не следует рекомендовать для производства пробиотиков.

Раздел 4. Определение безопасности пробиотических штаммов

Определение вирулентности, токсичности, токсигенности и безвредности осуществляют в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в опытах *in vivo*».

Животные. Для токсикологических исследований используют здоровых животных, полученных из сертифицированных питомников. Вирулентность, токсигенность, токсичность («общую», «острую» и «хроническую»), безвредность, дермoneкротические и другие свойства испытуемых штаммов пробиотиков определяют не менее чем на 2 видах (нелинейных или линейных) или 2 линиях одного вида животных в зависимости от изучаемого штамма. Исследования проводят на животных обоего пола. Данные, полученные в опытах на самках и самцах, учитывают отдельно для оценки воспроизводимости результатов испытания.

Для исключения большого разброса в исследуемых показателях следует использовать животных одного возраста. Разброс по исходной массе тела не должен превышать $\pm 10\%$. Рекомендуемая масса тела животных в начале опыта: мыши – от 10 до 14 г; крысы – от 100 до 140 г; морские свинки – от 250 до 450 г; кролики – от 1,5 до 2,5 кг.

Партия животных из питомника должна сопровождаться ветеринарным свидетельством или ветеринарной справкой. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет не менее 3–4 сут. В течение карантина проводят ежедневный осмотр животных (оценивают общее состояние и поведение). В случае гибели в этот период более 10 % поступивших животных испытание токсичности на данной партии исключается.

Клетки с животными помещают в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температуру воздуха поддерживают в пределах 19 – 25 °С, относительную влажность – 30 – 70 %. Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Рекомендуется давать животным стандартную диету в соответствии с действующими нормами. Для обеспечения водой мелких лабораторных животных целесообразно использовать автопоилки. Кормление следует

производить в фиксированное время, т.к. прием пищи может изменить чувствительность животных. Наряду с подопытными животными из этой же партии в аналогичных условиях содержатся контрольные животные.

Формирование групп подопытных и контрольных животных проводят методом случайной выборки (единица выборки - животное).

Материалы: испытуемые тест-штаммы; оптический стандарт мутности на 5 и 10 МЕ; селективные питательные среды; шприцы вместимостью 1 мл с ценой деления 0,05 мл и вместимостью 2 мл с ценой деления 0,1 мл.

4.1. Определение дермoneкротических свойств испытуемых штаммов пробиотиков

Для этой цели используют белокожих кроликов породы Шиншилла массой 1,5 – 2,5 кг или морских свинок массой 300 – 450 г.

Разные концентрации микробной взвеси в объеме 0,1 – 0,2 мл вводят внутрикожно в область спины. При этом используют тонкие (№ 18 – 20) острые иглы с небольшим скосом. Кожу в месте введения взвеси предварительно освобождают от шерсти и обрабатывают 70° спиртом. В месте введения кожу растягивают пальцами левой руки, правой рукой вводят иглу под острым углом. Конец иглы должен быть виден через эпидермис: при введении материала эпидермис приподнимается в виде четко ограниченного бугорка, кожа над ним становится прозрачной и пористой. Результат учитывают ежедневно в течение 3 – 4 сут. Отмечают появление отека, красноты, наличие некроза. Следует иметь в виду, что вследствие неодинаковой чувствительности животных необходимо использовать не менее 2 кроликов или морских свинок.

Обязательно при испытании каждому животному следует ввести взвесь штамма бактерий, обладающего дермoneкротической активностью (контроль чувствительности животных).

При учёте результатов отмечают размер гиперемии, отека и некроза, измеряя диаметр в мм.

4.2. Определение «острой» токсичности испытуемых штаммов пробиотиков

При изучении «острой» токсичности для определения LD₅₀ или максимально переносимой дозы однократно животным вводят несколькими способами (внутривенно, внутривентально, перорально) 3 или 4 разные дозы испытуемых культур пробиотических штаммов или готовых препаратов. Контрольной группе животных теми же способами вводят 0,9 % раствор натрия хлорида. В той же группе оставляют интактных животных (контрольная группа 2).

Внутривенные и внутривентальные инъекции максимально переносимых доз испытуемых препаратов позволяют выявить органы-мишени для испытуемого штамма пробиотика, характер и степень выраженности морфологических изменений в этих органах. Сравнение параметров токсичности при разных путях введения может дать представление о сходстве или различии в механизмах токсического действия испытуемых штаммов или препаратов и причинах летального исхода у животных (табл. 1).

Таблица 1 – Максимально допустимые объемы жидкости для некоторых видов лабораторных животных в зависимости от пути введения

Вид животных	Масса тела, г	Путь введения/объем введения, мл				
		в желудок	под кожу	в мышцу	в вену	в брюшную полость
Мышь	10 – 14	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0	0,5	0,2 – 0,5	0,5 – 1,0
Крыса	100 – 140	3,0	5,0 – 10,0	5,0	2,0	5,0
Морская свинка	250 – 300	4,0 – 5,0	15,0	5,0	5,0 – 8,0	5,0
Кролик	1500 – 2500	100,0	30,0	15,0	20,0	20,0 – 30,0

Примечание. Максимальные объемы должны вводиться мышам в течение 5 с, крысам и морским свинкам – в течение 10 с, кроликам – в течение 20 с.

Общая продолжительность наблюдений за животными должна составлять не менее 7 сут. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т.ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Через 24 ч и 7 сут осуществляют взятие материала из внутренних органов выживших животных (не менее 5 животных на каждый способ введения соответственно).

Обязательному исследованию подлежат все животные, павшие в течение срока наблюдения. Перед взятием материала из внутренних органов осуществляют их визуальный осмотр. Макроскопические изменения каждого органа фиксируют в журнале. Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида животных, оказавшегося более чувствительным к токсическому воздействию препарата. Во всех экспериментах, предусматривающих выполнение патоморфологических исследований, используют равное количество контрольных животных (после введения 0,9 % раствора натрия хлорида и интактных) (табл. 2).

Таблица 2 –Схема определения «острой» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата пробиотика

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта, сут	Срок забора внутренних органов, сут
Внутрибрюшинно и при необходимости внутривенное	Не менее 3 доз для вычисления LD ₅₀ или максимально переносимой дозы в случае невозможности	Однократно	7 с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации, гибели животных	1 и 7

	определения LD ₅₀			
Перорально	Максимальная переносимая доза	Однократно	7 с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	1 и 7

4.3. Определение «хронической» токсичности испытываемых штаммов пробиотиков

Целью хронических токсикологических экспериментов является характеристика степени повреждающего действия исследуемых штаммов или препаратов при их длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование степени обратимости вызываемых ими повреждений.

«Хроническую» токсичность определяют не менее чем на 2 видах животных (или 2 линиях одного вида). Обязательным путем введения испытуемого штамма является пероральный способ независимо от лекарственной формы готового препарата.

Продолжительность введения пробиотиков при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности их применения в клинике (табл. 3).

Таблица 3 — Схема определения «хронической» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта	Срок забора внутренних органов, сут
Перорально	Эквивалент суточной человеческой дозы*	Ежедневно в течение 14 или 30 сут в зависимости от предполагаемого курса лечения	14 или 30 сут с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	15 и 22 31 и 37

* Суточную дозу, эквивалентную человеческой (E_d) на кг массы тела животного, рассчитывают по формуле: $E_d = M_{\text{ж}} \cdot ЧД / M_{\text{ч}}$, где $M_{\text{ж}}$ — масса тела животного;

ЧД – человеческая доза;

M_q – масса тела человека (масса тела взрослого человека 70 кг, масса тела ребенка – 10 кг).

Пример расчета: $M_{ж} = 10\text{г}$; $M_q = 10\text{кг} = 1 \cdot 10^4\text{ г}$; ЧД = $1 \cdot 10^9\text{ КОЕ/г}$

$$\Xi_d = 10 \cdot 1 \cdot 10^9 / 1 \cdot 10^4 = 1 \cdot 10^6\text{ КОЕ/г}$$

Препарат вводят не менее чем 20 животным 1 раз в сутки в дозе, эквивалентной предлагаемой для человека, при пересчете на 1 кг массы. Перерыв в курсе введения не допускается. Наблюдение за животными проводят в течение периода введения препарата и последующих 7 сут. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т.ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Для проведения гистологического исследования на 1 и 7 сут после последнего введения препарата забивают не менее 5 животных на каждый способ введения соответственно. Гистологическому исследованию подвергают также органы всех животных, павших в течение периода наблюдения.

Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида или линии животных, оказавшихся более чувствительными к токсическому действию препарата.

4.4. Патоморфологическое исследование

Забой животных проводят эфирным наркозом с последующей декапитацией. Вскрытие и осмотр внутренних органов проводят сразу после забоя, обращая внимание на состояние серозных покровов и содержимое полостей. Определяют, сравнивая с контролем, массу, цвет, степень кровенаполнения органов, цвет и вязкость крови, наличие кровоизлияний (табл. 4).

Таблица 4 – Органы животных, подлежащие гистологическому исследованию

Способ введения испытуемого препарата	Исследуемые органы
---	--------------------

Внутривенный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации, стенка вены и подкожная клетчатка в месте введения
Внутрибрюшинный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации
Пероральный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, корень языка, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, мезентериальные лимфатические узлы

Фиксацию тканей органов проводят в 10 % растворе нейтрального формалина. Для этого 1 часть 40 % раствора формальдегида разводят 9 частями воды. Готовят раствор обязательно на водопроводной воде, т.к. вода очищенная вызывает набухание тканей. После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации.

Методика окраски срезов

Депарафинирование срезов. Парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя – бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, т.к. парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

Депарафинирование осуществляют по следующей схеме (табл. 5).

Таблица 5 – Методика депарафинирования срезов

Среда	Время, условия
Ксилол 1	10 – 15 мин, можно в термостате при 37°C
Ксилол 2	3 – 5 мин
Спирт абсолютный 1	1 – 2 мин
Спирт абсолютный 2	Ополоснуть
Спирт 96° 1	Ополоснуть
Спирт 96° 2	Ополоснуть
Вода очищенная	2 смены

После депарафинирования 100 – 350 препаратов реактивы заменяют.

Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином. Наиболее часто применяется окрашивание срезов гематоксилин-эозином. Этим методом можно окрашивать целлоидиновые срезы, депарафинированные, парафиновые или замороженные срезы.

Для окрашивания ядер используется гематоксилин. Наиболее распространенным является гематоксилин Эрлиха. Для его приготовления 2,0 г гематоксилина растворяют в 100 мл 96° спирта и к полученному раствору добавляют 100 мл воды очищенной, 100 мл глицерина, 3,0 г калийных квасцов и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Все ингредиенты нужно добавлять в указанной последовательности. Полученный раствор необходимо поставить на свету и при доступе воздуха не менее чем на 15 дней с тем, чтобы гематоксилин успел окислиться в гематеин, который и является красящим веществом. Банку с раствором при этом накрывают бумажным колпачком или сложенной в несколько раз марлей. Для доокрашивания цитоплазмы после окраски ядер гематоксилином чаще всего используется 1 % водный раствор эозина.

Порядок окрашивания срезов гематоксилин-эозином следующий:

- 1) срезы переносят в дистиллированную воду на 5 – 10 мин;
- 2) окрашивают гематоксилином Эрлиха 2 – 5 мин;
- 3) промывают в воде очищенной 1 – 2 с;
- 4) промывают в водопроводной воде 3 – 5 мин;
- 5) осуществляют контроль под микроскопом;
- 6) дифференцируют 1 % раствором хлористоводородной кислоты в 70° спирте 1 – 2 с;
- 7) быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене воды; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей;
- 8) осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить

(срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом);

9) промывают в воде очищенной 5 – 10 мин;

10) наносят 1% водный раствор эозина на 0,5 – 1,0 мин;

11) промывают в воде очищенной (и дифференцируют, т.к. вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза;

12) проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

В спиртах эозин также отмывается, так что проводить срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2 – 3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково.

При необходимости для уточнения характера выявленных изменений могут быть использованы другие методы окраски (окраска на фибрин, липиды, мукополисахариды и т.д.).

При изучении микропрепаратов обращают внимание на следующие изменения:

1. Нарушение в системе микроциркуляции (перераспределение крови с депонированием ее в паренхиматозных органах, стаз, агрегация эритроцитов в капиллярах и тромбообразование, повышение проницаемости стенок сосудов с развитием геморрагий, плазморрагий, мукоидной и фибриноидной дезорганизации, фибриноидного некроза).

2. Дистрофические и воспалительные изменения во внутренних органах.

3. Состояние бронхиальной системы (признаки бронхоспазма, отек стенок бронхов, десквамация слизистой оболочки, присутствие эритроцитов в просвете бронхов и альвеол) и перибронхиальных лимфатических узлов.

4. Изменения миокарда, эндокарда и перикарда (отек стромы, миоцитоллиз, мукоидное набухание миокардиоцитов, воспалительная инфильтрация и продуктивная реакция).

5. Характер и степень выраженности изменений в клубочковом и канальцевом аппарате почек.

6. Характер перестройки в органах иммунитета и кроветворения (тимусе, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге).

7. Дистрофические и микроциркуляторные изменения в ЦНС.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз пробиотика, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств. Однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для клинических испытаний.

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

1. Соотношение терапевтической и безопасной дозы (LD_{50} или максимально переносимой дозы).

2. Характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени воздействия штамма или препарата на внутренние органы испытуемых животных при исследовании «острой» и «хронической» токсичности для оценки возможных побочных реакций и определения необходимых ограничений при клинических испытаниях.

4.5. Содержание отчета об исследовании «острой» и «хронической» токсичности

Отчет об изучении «острой» и «хронической» токсичности испытуемого пробиотического штамма или препарата пробиотика должен быть составлен по определенному плану и содержать следующие необходимые разделы.

1) Введение (цель и задачи исследования).

2) Материалы и методы (биологические характеристики производственного штамма и препарата, характеристики животных, условия

их содержания, методы формирования групп и отработки доз, способы забоя животных, методы приготовления гистологических препаратов).

3) Результаты исследований (описание макро– и микроскопических изменений).

4) Заключение о наличии или отсутствии «острой» и «хронической» токсичности испытуемого штамма или препарата, в котором указываются возможные побочные эффекты и ограничения для проведения клинических испытаний.

Результаты макро- и микроскопического исследования органов животных, получавших исследуемый препарат, препарат сравнения, а также контрольных животных регистрируют в протоколах и заносят в регистрационную карту; документируют микрофотографиями (табл. 6 и 7). На основании полученных результатов оформляют заключение о токсических свойствах испытуемого препарата. Указанные материалы вместе с другими формами документации представляют в соответствующий Государственный уполномоченный орган. Гистологические препараты и парафиновые блоки сохраняют до принятия решения по результатам доклинического испытания препарата.

Таблица 6 – Форма протокола для макроскопического исследования по результатам исследования «острой» и «хронической» токсичности пробиотического штамма

Сроки проведения опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	Количество животных	Описание макроскопических изменений

Таблица 7 – Форма протокола для микроскопического исследования по результатам исследования «острой» и «хронической» токсичности пробиотического штамма

Сроки проведения опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	Количество животных	Внутренние органы*												ЦНС
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Головной мозг

* 1 – легкие, 2 – печень, 3 – селезенка, 4 – сердце, 5 – почки, 6 – надпочечники, 7 – тимус, 8 – место введения, 9 – желудок, 10 – тонкий кишечник, 11 – толстый кишечник, 12 – регионарные л/у.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой многократное ферментно-опосредованное умножение (амплификацию) заданного участка ДНК длиной от десятков до нескольких тысяч пар оснований (п.о.), границы которого соответствуют коротким олигонуклеотидным последовательностям – праймерам, т.е. ПЦР представляет собой циклический синтез *in vitro* выбранного фрагмента ДНК. Каждый цикл состоит из трёх этапов: денатурации, гибридизации и синтеза цепи ДНК. Для выявления РНК-содержащих микробов ПЦР проводят после процедуры обратной транскрипции.

Специфичность реакции обеспечивается прежде всего правильным выбором праймеров.

По окончании реакции наличие искомого фрагмента выявляют различными методами. Наиболее распространены электрофоретическое разделение и детекция флуоресценции в режиме реального времени.

ПЦР может применяться как качественная реакция (по принципу «есть – нет»), так и как полуколичественный или количественный метод.

Для проведения анализа могут быть использованы наборы реагентов для ПЦР, зарегистрированные в установленном порядке и валидированные для соответствующих целей.

Пробоподготовка

Определяемая ДНК может быть выделена из исследуемого образца или может вноситься в реакцию без предварительной подготовки.

В первом случае следует подтвердить, что процедура выделения не влияет на результаты ПЦР. С этой целью целесообразно провести аналогичную процедуру выделения с использованием стандартного образца ДНК. Процедура выделения может быть ручной или в автоматическом режиме.

Во втором случае при внесении в реакцию тестируемого материала без проведения его предварительной подготовки, необходимо подтвердить отсутствие влияния на результаты ПЦР веществ, входящих в состав исследуемого образца. Для этого целесообразно использовать метод добавок.

Необходимо предусмотреть использование стандартных или контрольных образцов для оценки эффективности выделения нуклеиновых кислот.

Используемое оборудование, реагенты, стандартные и контрольные образцы, приготовление растворов и все этапы пробоподготовки должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации или должна быть приведена ссылка на инструкцию по применению набора реагентов для выделения ДНК/РНК.

Проведение реакции

ПЦР проводят в буферно-солевом растворе с определенным значением pH, содержащем необходимую концентрацию ионов магния, четыре вида дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и термостабильную Taq-полимеразу (ДНК-полимераза ряда микроорганизмов, например, *Termus aquaticus* обладает уникальным свойством сохранять активность при температуре 95°C). Состав буферного раствора, концентрацию реагентов, приготовление растворов указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР. Реакция инициируется парой праймеров, каждый из которых представляет собой последовательность из 20-25 нуклеотидов, один праймер комплементарен последовательности ДНК с 5'-конца амплифицируемого участка, а другой – с 3'-конца. Последовательность праймеров, их

концентрацию указывают в фармакопейной статье и нормативной документации.

Для оценки эффективности амплификации следует использовать положительные и отрицательные стандартные и/или контрольные образцы, указанные в фармакопейной статье и нормативной документации или в инструкции по применению набора реагентов.

ПЦР осуществляют в автоматическом режиме на специальных программируемых приборах – амплификаторах, контролирующих заданные параметры реакции: температуру и длительность отдельных этапов цикла (денатурация, гибридизация и синтез цепи ДНК), число циклов и т.д.

Денатурация. Выдерживание при температуре от 94 до 96 °С в течение установленного времени; при этом двойная цепь денатурируется (расплетается) с образованием двух одноцепочечных молекул ДНК.

Гибридизация (отжиг). При температуре 45 – 65 °С в течение установленного времени происходит гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК-матрицы, в процессе которого праймеры распознают комплементарные им участки матричной ДНК.

Синтез цепи ДНК (элонгация). При температуре 65 – 72 °С в течение установленного времени происходит репликация (дистраивание) одной из одноцепочечных ДНК от точки связывания праймера «вправо» (для одной цепи ДНК) и «влево» (для другой цепи ДНК). В результате вновь синтезируемые молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий.

Продолжительность цикла составляет 0,5 - 5 мин. Сразу после окончания первого цикла процедура повторяется и происходит экспоненциальное увеличение содержания фрагментов ДНК. Обычно ПЦР состоит из 25–40 циклов. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка ДНК, приводящее к увеличению в геометрической прогрессии общего содержания продуктов реакции.

Эффективность ПЦР и количество синтезированного при этом

заданного фрагмента ДНК зависит от многих факторов, среди которых следует выделить: тип и термопроводящие характеристики амплификатора, тип используемой ДНК-полимеразы, состав буферного раствора, объем реакционной смеси; длину и первичную структуру праймеров; выбранную специфическую последовательность ДНК.

Используемое оборудование и режим амплификации указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР.

Детекция продуктов амплификации

Электрофоретическое разделение. Продукты амплификации анализируют с помощью различных методов электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Для визуализации ДНК используют окрашивание интеркалирующим красителем (обычно - бромистым этидием, дающим характерное красноватое свечение при исследовании в проходящем ультрафиолетовом свете), серебра нитратом или используют мечение различными флюорохромами, дающими флюоресценцию определенной длины волны при возбуждении лазерным лучом. Для оценки размеров амплифицированных фрагментов используют маркеры и стандартные образцы.

Концентрацию геля, приготовление растворов, маркеры, стандартные образцы и условия электрофореза указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Детекция флюоресценции в режиме реального времени. Способ детекции амплифицированного фрагмента с использованием флюоресцентных меток возможен при проведении ПЦР в реальном времени (Real Time PCR). Отличительной чертой данного метода, в сравнении с классической ПЦР, является возможность не только качественного (по конечной точке или в режиме «реального времени»), но и количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза и автоматическая регистрация детектируемого сигнала.

Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации продукта ПЦР, что в сочетании с возможностью оценить кинетику процесса позволяет проводить количественное определение выбранной последовательности.

Для постановки ПЦР в реальном времени необходим амплификатор, обладающий способностью возбуждать и детектировать флуоресценцию на каждом цикле амплификации. Прибор состоит из трех блоков: амплификатора (термический блок), флуоресцентного детектора и компьютера с прилагаемым программным обеспечением.

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют интеркалирующие красители (например, SybrGreen I) или специфические флуоресцентные зонды (например, система TaqMan). В первом варианте флуоресцентный краситель связывается с синтезируемой двухцепочечной ДНК с возникновением флуоресцентного свечения.

Во втором варианте используются ДНК-зонды, в состав которых введена флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции. На стадии элонгации полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и по достижении участка зонда расщепляет его, благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности. В результате происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению детектируемого свечения.

Используемые реагенты, оборудование, условия ПЦР и программу расчета указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР.

Оценка результатов

Полученные результаты учитывают, если одновременные испытания положительных и отрицательных стандартных или контрольных образцов дают соответственно положительные и отрицательные ответы.

При необходимости определения нуклеиновой кислоты, для которой установлено предельно допустимое содержание ДНК, следует проводить сравнение с результатом ПЦР стандартного образца с соответствующей концентрацией.

Для количественного определения специфической нуклеиновой кислоты следует использовать метод ПЦР в реальном времени и стандартный образец, аттестованный в установленном порядке.

Обеспечение качества

Используемое оборудование должно быть аттестовано в установленном порядке.

Методика на основе ПЦР для неколичественного определения должна быть охарактеризована по специфичности и аналитической чувствительности. Аналитическую чувствительность определяют как минимальное количество целевых последовательностей (ДНК/РНК) в единице объема образца, которое может быть обнаружено в 100 % образцов при 10-кратном проведении анализа или в 95 % образцов при 24-кратном проведении анализа. Количество ДНК/РНК может быть выражено в международных единицах или числом копий.

Методика для количественного определения должна быть охарактеризована по специфичности, диапазону линейности, правильности и прецизионности. Для установления указанных характеристик используются соответствующие международные стандартные образцы, а также стандартные образцы, аттестованные в установленном порядке.

Стандартные и контрольные образцы

Используемые стандартные образцы должны быть аттестованы в установленном порядке, контрольные образцы – охарактеризованы по необходимым показателям. Могут использоваться стандартные и контрольные образцы набора реагентов после валидации методики.

При каждой постановке ПЦР необходимо предусмотреть использование следующих образцов:

- положительный стандартный и/или контрольный образец, предназначенные для оценки эффективности всех этапов ПЦР, которые должны содержать определенное количество целевой последовательности;
- положительный контрольный образец, содержащий определенное количество целевой последовательности, предназначенный для оценки этапа амплификации;
- отрицательный контрольный образец, являющийся свободным от целевых последовательностей, для контроля отсутствия ложноположительных результатов, начиная с этапа пробоподготовки;
- отрицательный контрольный образец, являющийся свободным от целевых последовательностей, для контроля отсутствия ложноположительных результатов на этапе амплификации.

**Метод спектроскопии ЯМР для
определения подлинности
полисахаридных вакцин**

ОФС.1.7.2.0014.15

Вводится впервые

Метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) предназначен для идентификации и контроля подлинности полисахаридных вакцин.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – физический метод анализа, основанный на регистрации переходов между ядерными магнитными энергетическими уровнями молекул вещества, находящегося в постоянном магнитном поле. Переходы между ядерными магнитными уровнями возможны для ядер, обладающих ненулевым магнитным моментом, то есть для ядер со спиновым квантовым числом I , не равным нулю. Практическое значение с точки зрения распространённости и чувствительности имеет наблюдение ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F и ^{31}P . Все перечисленные магнитно-активные ядра имеют спин, равный $\frac{1}{2}$. Набор переходов между всевозможными магнитными энергетическими состояниями магнитно активных ядер в молекуле составляет спектр ЯМР. Спектр ЯМР является характеристическим для каждого вещества и поэтому может применяться для его идентификации. На результирующий спектр ЯМР оказывают влияние условия регистрации: агрегатное состояние вещества, температура, наличие других веществ в анализируемом образце.

Основными характеристиками спектров ЯМР являются химический сдвиг, измеряемый в миллионных долях (м.д.), мультиплетность, интегральная интенсивность сигналов, а также константы спин-спинового

взаимодействия, определяющие расщепление сигналов ЯМР и измеряемые в герцах (Гц). Эти характеристики зависят от химического окружения данного ядра или группы ядер, от типа и числа соседних ядер, обладающих магнитным моментом, от их пространственного расположения, а также от условий, в которых регистрируется спектр ЯМР.

С целью идентификации и контроля подлинности полисахаридных вакцин регистрируются спектры ЯМР на ядрах углерода ^{13}C (ЯМР ^{13}C) в контролируемых условиях. Спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H для образцов полисахаридов не является характеристической из-за сильного перекрывания сигналов.

Регистрация спектра ЯМР ^{13}C

Предварительно в датчике спектрометра ЯМР устанавливают температуру 35 °С. В случае исследования вязких растворов температура может быть увеличена до 70 °С. Перед началом регистрации спектра исследуемый образец выдерживают в датчике спектрометра для установления необходимой температуры не менее 5 мин. Для калибровки шкалы химических сдвигов спектрометра регистрируют спектр ЯМР ^{13}C 20 % раствора 1,4-диоксана в дейтерия оксида (D_2O). Химический сдвиг сигнала 1,4-диоксана устанавливают как 67,4 м.д. Спектры ЯМР ^{13}C образцов полисахаридных вакцин регистрируют в тех же условиях.

Параметры регистрации спектров ЯМР ^{13}C образцов полисахаридных вакцин:

Величина импульса: 45 °;

Спектральное разрешение: < 1 Гц/точка;

Время между импульсами: не менее 1 с;

Температура регистрации: 35 °С.

Параметры обработки спектров ЯМР ^{13}C :

Взвешивающая функция: экспонента;

Параметр уширения взвешивающей функции: 2 Гц;

Коррекция базовой линии: полиномиальная.

Критерии пригодности спектров ЯМР ^{13}C для анализа:

Отношение сигнал/шум: $\geq 10:1$;

Результирующая ширина спектральных линий: < 20 Гц.

Анализ спектров ^{13}C образцов полисахаридных вакцин:

- выделяется спектральный диапазон аномерных атомов углерода 95–105 м.д.;
- в выделенном спектральном диапазоне идентифицируются характеристические сигналы для полисахаридов вакцины. Эти сигналы должны быть охарактеризованы определёнными химическими сдвигами, уникальными для данного полисахарида, с соответствующими доверительными интервалами;
- в выделенном спектральном диапазоне определяется отсутствие других сигналов, не относящихся к полисахаридам вакцины;
- записывается ^{13}C спектр, соответствующий спектральному диапазону аномерных атомов углерода, с указанием цифровых значений химических сдвигов всех характеристических сигналов. Также приводится запись полного спектра (0 – 210 м.д.) с указанием цифровых значений химических сдвигов характеристических сигналов.

Для идентификации и определения подлинности полисахаридной вакцины требуется одновременное выполнение условий как наличия всех характеристических сигналов с определёнными химическими сдвигами, находящихся в границах доверительных интервалов, так и отсутствия любых других сигналов, не относящихся к целевому полисахариду.

Конкретный набор характеристических сигналов с соответствующими доверительными интервалами приводится в фармакопейной статье и нормативной документации.

Примечания.

1. Испытуемый образец. Образец массой от 10 до 20 мг (количество должно быть достаточным для регистрации спектра ^{13}C , пригодного для анализа в соответствии с критерием пригодности по соотношению сигнал/шум) растворяют в 0,6 мл дейтерия оксида (D_2O) 99,9 ат. % D, раствор

центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в помеченную ампулу для регистрации спектров.

2. Раствор для калибровки. В ампулу для спектроскопии ЯМР помещают 480 мкл D₂O, добавляют 120 мкл 1,4-диоксана и перемешивают.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Общие принципы анализа
цитокинов и интерферонов
методом ВЭЖХ**

ОФС.1.7.2.0015.15

Вводится впервые

Данная общая фармакопейная статья распространяется на анализ цитокинов и интерферонов методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Метод ОФ ВЭЖХ также используется для установления подлинности и определения содержания действующего вещества, специфических и неспецифических примесей группы цитокинов и интерферонов, а также ряда вспомогательных веществ, входящих в состав данной группы иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Метод обращенно-фазной ВЭЖХ

Принцип метода ОФ ВЭЖХ основан на распределении компонентов смеси между полярным элюентом и неполярными группами алкидных цепочек на поверхности сорбента. В условиях ОФ ВЭЖХ для цитокинов и интерферонов характерно наличие нескольких точек связывания с сорбентом, вследствие чего переход от прочной, почти полной сорбции вещества в неподвижной фазе к его преимущественному нахождению в подвижной фазе может быть очень резким. Постепенное увеличение силы элюента (например, повышение концентрации органического растворителя) может длительное время оставаться без видимого эффекта. Затем, при достижении критического значения элюирования, происходит быстрое перераспределение вещества в пользу подвижной фазы. В связи с этим анализ цитокинов и интерферонов методом ОФ ВЭЖХ проводят в условиях

градиентного элюирования, в процессе которого для каждого белка создаются условия быстрой десорбции.

Градиентное элюирование

Величина среднего фактора ёмкости (k), характеризующего удерживание сорбента в условиях градиентного элюирования, прямо пропорциональна продолжительности градиента и обратно пропорциональна разнице в содержании органического растворителя в начальной и конечной точках градиента. Для получения удовлетворительных значений k ($1 \leq k \leq 10$) для молекул белков цитокинов и интерферонов необходимо использовать разделение с продолжительным временем градиента и, по возможности, с меньшей разницей в содержании органического растворителя в начальной и конечной точках градиента. Как правило, продолжительность градиента в большинстве методик анализа цитокинов и интерферонов не превышает 60 мин.

Другим важным параметром является крутизна градиента – изменение процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе в единицу времени. В связи с тем, что в препаратах цитокинов и интерферонов наряду с основным действующим веществом содержатся, как правило, близкородственные примеси, нужно задавать необходимую пологую форму градиента ($\approx 1\%$ в мин), которая позволяет обеспечить достаточно четкое разрешение пиков для определения чистоты препарата.

Выбор подвижной фазы. В обращённофазной хроматографии подвижная фаза состоит из буферного раствора и органического растворителя. При разделении белков и пептидов в состав растворов подвижной фазы, как правило, входят разбавленные растворы кислот: фосфорной, трифторуксусной, муравьиной, уксусной или гептафтормасляной.

В качестве органического компонента подвижной фазы при анализе белков и пептидов методом ОФ ВЭЖХ наиболее часто используется ацетонитрил, обладающий низкой вязкостью и низким поглощением в УФ

диапазоне с высоким разрешением и получением узких пиков правильной формы. Помимо ацетонитрила, в состав подвижной фазы могут входить метанол, пропанол и изопропанол. Детектирование пептидов и белков проводится по УФ-поглощению пептидной связи в диапазоне от 205 до 220 нм.

Выбор колонки. Наиболее часто для анализа пептидов и белков используются колонки с сорбентами на основе силикагеля с привитыми лигандами в виде прямоцепочечных алкильных групп (C_4 , C_8 , C_{18} и размером частиц не более 5 мкм), увеличение длины цепи которых увеличивает время удерживания определяемых компонентов.

Температура колонки. При испытании показателя подлинности лекарственных препаратов для получения воспроизводимых результатов времени удерживания анализируемых компонентов необходимо обеспечить термостатирование колонки с точностью $\pm (0,1 - 0,2) ^\circ\text{C}$.

Анализ вспомогательных веществ

Метод ОФ ВЭЖХ используется также для определения содержания в препаратах цитокинов и интерферонов таких вспомогательных веществ, как маннит, бензиловый спирт, *m*-крезол, полисорбат-80 и метионин. Все перечисленные вещества, за исключением метионина, анализируются в изократических условиях. Для анализа метионина используют режим градиентного элюирования.

Для анализа всех веществ, за исключением маннита, используются колонки, заполненные обращённофазными сорбентами C_{18} или C_8 с размером частиц 5 мкм и порами размером 60 – 120 Å. Для определения маннита используют колонку, заполненную силикагелем, к поверхности которого привиты лиганды, содержащие аминокислоты.

При определении содержания маннита, полисорбата-80, *m*-крезола в качестве подвижной фазы используют смеси ацетонитрила или метанола в различной концентрации с водой. Для определения спирта бензилового используют смесь ацетонитрила (или метанол) с ацетатным буфером (рН

5,6).

Полисорбат-80 определяют по количеству образовавшейся в процессе щелочного гидролиза олеиновой кислоты или по суммированным пикам без дополнительной обработки лекарственного средства.

Для обнаружения всех вспомогательных веществ, за исключением маннита, используют УФ-детектор. При определении маннита применяют рефрактометрический детектор.

Условия проведения анализа (пробоподготовка, тип колонки, состав подвижной фазы, вид элюирования, способ детектирования, учёт и интерпретация результатов) должны быть изложены в фармакопейных статьях или нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

Определение ионов	ОФС.1.7.2.0016.15
алюминия в сорбированных	
иммунобиологических	Взамен ГФ Х
лекарственных препаратах	Взамен ОФС 42-0090-11

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, предназначенный для количественного определения ионов алюминия комплексонометрическим методом в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на реакции комплексообразования ионов алюминия с натрия эдетатом (трилон Б) с последующим обратным титрованием избытка трилона Б.

Комплексонометрическое титрование

В колбу из термостойкого стекла вместимостью 100 мл вносят необходимое количество исследуемого образца, прибавляют 2 мл 10 % раствора серной кислоты и перемешивают.

При анализе сухого препарата (например, секстаанатоксина) делают разведение в соответствии с инструкцией к лекарственному препарату. На анализ отбирают испытуемый раствор и прибавляют 4-5 мл 5 % раствора серной кислоты. Содержимое колбы доводят до слабого кипения. Во избежание выпаривания жидкости, в колбу после закипания раствора периодически вносят при перемешивании от 2 до 5 раз по 5 мл воды очищенной и продолжают нагревать до полного растворения осадка. Прозрачный раствор охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, 10 мл точно отмеренного 0,01 М раствора

трилона Б, перемешивают и нагревают до кипения. После охлаждения раствора до комнатной температуры прибавляют 25 мл 96°этилового спирта, 1 мл раствора дитизона и перемешивают. Избыток трилона Б титруют 0,01 М раствором цинка сульфата до перехода зеленой окраски раствора к красной.

В аналогичных условиях проводят анализ контрольной пробы, содержащей 1 или 2 мл воды очищенной и все вышеперечисленные реактивы. Содержание алюминия (X) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K_{\text{ZnSO}_4} \cdot (V - V_0) \cdot 0,2698}{V_n};$$

где:

K_{ZnSO_4} - поправочный коэффициент к титру 0,01 М раствора цинка сульфата;

V – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, пошедший на титрование контрольной пробы, в мл;

V_0 – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, пошедший на титрование испытуемого образца, в мл;

V_n – объем образца, взятое на анализ, в мл;

0,2698 – количество алюминия в миллиграммах, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора трилона Б.

Примечания.

1. Испытуемый образец – 2 мл (содержание 0,5-1,0 мг/мл алюминия) или 1 мл (содержание алюминия 1-2 мг/мл).

При испытании сухого образца (например, секстаанатоксина) делают разведение в соответствии с инструкцией по применению лекарственного средства. На анализ отбирают 1 мл испытуемого раствора.

При содержании алюминия в пробе выше 1 мг/мл объем прибавляемых реактивов (трилон Б и ацетатный буферный раствор) увеличивают в 2 раза.

Объем прибавляемого этилового спирта должен составлять не менее половины конечного объема реакционной смеси.

Поправочный коэффициент к 0,01 М раствору цинка сульфата рассчитывают по формуле:

$$K_{\text{ZnSO}_4} = 10 / V_k,$$

где:

10 – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, взятое на титрование контрольного раствора, в мл;

V_k – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, пошедшее на титрование контрольного раствора, в мл.

2. Аммиачный буферный раствор (pH 9,5 - 10,0). В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют 20 г аммония хлорида в 200 -300 мл воды очищенной, прибавляют 100 мл концентрированного раствора аммиака, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в таре из темного стекла с герметичной крышкой при комнатной температуре в течение 3 мес в специально отведенном месте.

3. Приготовление ацетатного буферного раствора (pH 4,5 - 5,0). В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл помещают 77 г аммония ацетата, прибавляют 60 мл уксусной кислоты ледяной и растворяют в 800 мл воды очищенной. Объем раствора доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

4. Приготовление раствора дитизона. Растворяют 25 мг дитизона в 100 мл ацетона, перемешивают и хранят при температуре 4 - 8 С в течение 1 мес.

5. Приготовление 0,01 М раствора натрия эдетата (трилон Б). Раствор готовят из фиксанала или взвешивают 3,7225 г (точная навеска) трилона Б и растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 мл в 500 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Титр раствора трилона Б устанавливают по 0,01 М раствору магния сульфата. К 20 мл точно отмеренного 0,01 М раствора магния сульфата прибавляют 5 мл аммиачного буферного раствора, около 0,2 г индикаторной смеси, 80 мл воды очищенной, перемешивают и титруют раствором трилона Б. Рассчитывают поправочный коэффициент аналогично расчету поправочного коэффициента к 0,01 М раствору цинка сульфата. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

6. Приготовление 0,01 М раствора магния сульфата. 0,1 М раствор магния сульфата готовят из 0,1 М стандарт-титра (фиксанала) магния сульфата в мерной колбе вместимостью 1000 мл согласно инструкции по приготовлению. Затем в мерную колбу вместимостью 100 мл наливают приготовленный раствор до метки, после чего содержимое колбы переливают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре течение 1 мес.

7. Приготовление индикаторной смеси. В фарфоровой ступке растирают 0,25 г индикатора эриохрома черного Т с 25 г натрия хлорида и перемешивают.

На 100 мл титруемого раствора берут около 0,2 г индикаторной смеси. Смесь хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

8. Приготовление 0,01 М раствора цинка сульфата гептагидрата. 0,01 М раствор цинка сульфата гептагидрата готовят из фиксанала. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес. При отсутствии фиксанала раствор готовят одним из следующих способов:

а) 2,8754 г (точная навеска) цинка сульфата гептагидрата растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

б) 0,6538 г (точная навеска) металлического цинка растворяют в 40 мл 50 % раствора серной кислоты в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

Титр раствора устанавливают по титрованному раствору трилона Б.

К 20 мл (точно отмеренному) 0,01 М раствору трилона Б прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, 25 мл этилового спирта и 1 мл раствора дитизона, перемешивают и титруют 0,01 М раствором цинка сульфата гептагидрата. После окончания титрования рассчитывают поправочный коэффициент.

**Спектрофотометрическое
определение фосфора в
иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0017.15

Взамен ОФС 42-0088-11

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, предназначенный для количественного определения фосфора с помощью спектрофотометрии в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на способности неорганического фосфора в кислой среде образовывать с молибденовой кислотой фосфорномолибденовую кислоту, которая в присутствии аскорбиновой кислоты дает цветную реакцию. Содержание фосфора определяется по результатам измерения оптической плотности растворов при 825 нм в видимой области спектра по калибровочному графику.

Определение фосфора с содержанием 1,2 -2,4 мкг/мл

В термостойкую пробирку размером 250 x 20 мм вносят 0,2 мл испытуемого образца, прибавляют 0,15 мл реактива для минерализации, закрывают стеклянным колпачком и минерализуют на песочной бане при температуре 180 °С до образования темно-коричневой жидкости. Минерализацию продолжают при температуре 250 °С не менее 10 ч до обесцвечивания содержимого пробирки. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольный образец, содержащий 0,2 мл воды очищенной и 0,15 мл реактива для минерализации.

Объем минерализата и контрольного образца доводят водой очищенной до 2 мл, перемешивают, прибавляют 2 мл цветного реактива и вновь перемешивают. Растворы помещают в водяную баню и выдерживают 2 ч при температуре 37 °С. Измеряют оптическую плотность испытуемых растворов при 825 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 0,15 мл реактива для минерализации, 1,85 мл воды очищенной и 2 мл цветного реактива.

Содержание фосфора (X) в 0,5 мл исследуемого образца в микрограммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 0,5}{B};$$

B

где: A – количество фосфора, найденное по калибровочному графику;

B – объем исследуемого образца, взятый на анализ, в мл,

Построение калибровочного графика. К 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл рабочего раствора калия дигидрофосфата (концентрация фосфора: 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 мкг) прибавляют воду очищенную до 1,95 мл, 0,05 мл реактива для минерализации, 2 мл свежеприготовленного цветного реактива и выдерживают на водяной бане 2 ч при температуре 37 °С. Измеряют оптическую плотность калибровочных растворов, как описано выше, по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1,95 мл воды очищенной, 0,05 мл реактива для минерализации и 2 мл цветного реактива. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество фосфора в мкг, а по оси ординат – среднее значение показателя оптической плотности при 825 нм.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Содержимое каждого флакона (ампулы) растворяют в 0,5 мл растворителя (вода очищенная).

2. Приготовление основного раствор калия дигидрофосфата (80 мкг фосфора в 1 мл). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,3509 г (точная навеска) калия дигидрофосфата, доведенного до постоянной массы в

эксикаторе над безводным кальция хлоридом, прибавляют 500 мл воды очищенной, 10 мл 5 М раствора серной кислоты, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Основной раствор калия дигидрофосфата хранят при комнатной температуре в течение 18 мес.

3. Приготовление рабочего раствора калия дигидрофосфата (2 мкг фосфора в 1 мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,25 мл основного раствора калия дигидрофосфата, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Рабочий раствор калия дигидрофосфата хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Приготовление реактива для минерализации. Смешивают в равных объемах серную кислоту концентрированную и 65 – 70 % хлорную кислоту. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 18 мес.

5. Приготовление 5 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл наливают 600 - 700 мл воды, осторожно при постоянном перемешивании добавляют 279,0 мл серной кислоты концентрированной, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 12 мес.

6. Приготовление 1,5 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 500 мл воды, осторожно несколькими порциями при помешивании приливают 83,5 мл серной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, охлаждают и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 12 мес.

7. Приготовление 2,5 % раствора аммония молибдата. Раствор готовят в конической колбе или химическом стакане вместимостью 1000 мл. Растворяют 25 г аммония молибдата при перемешивании в 700 мл кипящей воды очищенной и выдерживают на водяной бане 2 ч при температуре 37 °С. Раствор оставляют при температуре 18 -22 °С на сутки, затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через два слоя фильтровальной бумаги и хранят в склянке из темного стекла с притёртой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

8. Приготовление 10 % раствора аскорбиновой кислоты. В мерный цилиндр вместимостью 20 мл помещают 2 г аскорбиновой кислоты и растворяют в воде очищенной, затем объем раствора доводят до метки и перемешивают. Раствор готовят в день проведения анализа.

9. Приготовление цветного реактива. В химическом стакане при постоянном помешивании добавляют реактивы в следующем порядке: два объема воды очищенной, один объем 1,5 М раствора серной кислоты, один объем 2,5 % раствора аммония молибдата и один объем 10 % раствора аскорбиновой кислоты. Цветной реактив готовят перед проведением анализа.

**Определение нуклеиновых кислот
по методу Спирина
в иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0018.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения суммарного количества нуклеиновых кислот в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Определение количества нуклеиновых кислот проводится спектрофотометрическим методом после проведения кислотного гидролиза.

Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности гидролизатов ИЛП в ультрафиолетовой области спектра, характеризующей содержание фосфора нуклеиновых кислот. По результатам измерения оптической плотности растворов при 270 нм (максимум поглощения нуклеиновых кислот) и 290 нм (максимум поглощения примесей) определяется содержание нуклеиновых кислот.

Спектрофотометрический метод

К 1 мл испытуемого образца прибавляют 5 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты и перемешивают. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения гидролизат центрифугируют в течение 20 мин при 2000 об/мин, отделяют осадок от надосадочной жидкости и измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости в кювете с толщиной слоя 10 мм при 270 и 290 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл воды очищенной и 5 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты.

Содержание нуклеиновых кислот (X) в мкг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19} \cdot 10,3 \cdot 6,$$

где: A_{270} и A_{290} – значения оптической плотности, измеренные при соответствующих длинах волн;

0,19 – коэффициент удельной экстинкции нуклеиновых кислот (среднее значение разницы показаний оптической плотности ($D_{270} - D_{290}$), соответствующее содержанию 1 мкг фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл испытуемого раствора);

10,3 – коэффициент пересчета количества фосфора на нуклеиновые кислоты, мкг/мл;

6 – разведение испытуемого образца.

Метод применим при выполнении условия: показания оптической плотности при A_{270} и A_{290} не должны отличаться более чем на 15 %.

Содержание нуклеиновых кислот в ИЛП должно составлять от 15 до 35 мкг/мл.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. Исследуют 1 мл испытуемого образца или приготовленного, как указано в фармакопейной статье и нормативной документации.

2. 0,5 М раствор хлорной кислоты. Раствор готовят с учетом удельного веса и процентной концентрации исходного раствора кислоты хлорной.

Приготовление 0,5 М раствора хлорной кислоты из 70 % раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 42,07 мл 70 % раствора хлорной кислоты с удельным весом 1,664, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой при температуре от 18 до 25°C в течение 12 мес.

**Определение О - ацетильных групп
в полисахаридных вакцинах**

**ОФС.1.7.2.0019.15
Взамен ГФ Х**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах. Принцип метода заключается в способности О-ацетильных групп образовывать с гидроксиламином в щелочной среде гидроксамовую кислоту, которая в кислой среде дает цветную реакцию с ионами железа(III). Определение О - ацетильных групп проводится колориметрическим методом.

Колориметрический метод

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 2 мл свежеприготовленного реактива № 1, перемешивают и оставляют на 4 мин при температуре от 18 до 20 °С. К полученному раствору приливают 1 мл разведенной хлористоводородной кислоты, перемешивают, прибавляют 1 мл 0,37 М раствора железа (III) хлорида, вновь перемешивают и оставляют на 15 мин при температуре, указанной выше.

По окончании инкубирования измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл воды очищенной и реактивы, указанные выше и добавленные в той же последовательности.

Содержание О-ацетильных групп (X) в мкмоль/мл вычисляют по формуле:

$$X = A / B,$$

где: A – содержание О-ацетильных групп, найденное по калибровочному графику, мкмоль;

V – объем испытуемого раствора, мл.

Содержание О-ацетильных групп в 1 мл испытуемого раствора должно быть от 1,5 до 2,5 мкмоль/мл с учетом содержания влаги в лекарственном препарате.

Построение калибровочного графика. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора ацетилхолина йодистого (5 мкмоль О-ацетильных групп) прибавляют воду очищенную до 1 мл (конечная концентрация О-ацетильных групп 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мкмоль/мл соответственно). Далее анализ проводят, как указано выше.

Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию стандартного раствора ацетилхолина йодистого в мкмоль О-ацетильных групп, а по оси ординат – показания оптической плотности стандартных растворов при 540 нм.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора (0,1 % раствор испытуемого образца в воде очищенной), содержащий 1,5–2,5 мкмоль О-ацетильных групп. Приготовление испытуемого раствора указывается в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Стандартный раствор ацетилхолина йодистого 5 мкмоль О-ацетильных групп в 1 мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1360 г (точная навеска) ацетилхолина йодистого, прибавляют около 80 мл 0,001 М раствора натрия ацетата, перемешивают, доводят общий объем раствора тем же растворителем до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

3. 2 М раствор гидроксиламина. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 69,5 г гидроксиламина гидрохлорида в воде очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–8 °С в течение 1 мес.

4. 3,5 М раствор натрия гидроксида. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 70,0 г натрия гидроксида в воде очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

5. Реактив 1. Смешивают равные объемы 1 М раствора гидроксилamina и 3,5 М раствора натрия гидроксида. Реактив готовят в день проведения анализа.

6. Хлористоводородная кислота разведенная. Смешивают 1 объем хлористоводородной кислоты концентрированной с 2 объемами воды очищенной. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 6 мес.

7. 0,37 М раствор железа (III) хлорида. Растворяют 50,0 г железа (III) хлорида 6-водного в 0,1М растворе хлористоводородной кислоты в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

8. 0,001 М раствор натрия ацетата. Растворяют 0,0680 г натрия ацетата тригидрата в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Устанавливают в растворе рН 4,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

9. 1 М раствор хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл, содержащую 200–300 мл воды очищенной, помещают 4,13 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 6 мес.

Федеральная энциклопедия
медицинская биология

**Определение бычьего
сывороточного альбумина
методом ракетного
иммуноэлектрофореза в
иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0020.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения бычьего сывороточного альбумина в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Определение содержания бычьего сывороточного альбумина (БСА) проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза.

Метод основан на способности антигена мигрировать в электрическом поле в гель, содержащий антисыворотку; в результате реакции взаимодействия антигена с антисывороткой образуются линии преципитации в виде пиков (ракет), высота которых пропорциональна концентрации внесенного антигена.

Метод ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ)

В химическую пробирку с 16 мл 1 % геля агарозы, расплавленного и охлажденного до температуры 56 °С прибавляют 16мкл сыворотки против БСА с титром 1:1000 или 32 мкл той же сыворотки с титром 1:500 или 80 мкл кроличьей диагностической сыворотки, преципитирующей белки сыворотки крови рогатого скота (анти-СРС), предназначенной для судебно-медицинских целей (титр антител 1:10000), и перемешивают, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку размером 120×90 мм, помещенную на ровную горизонтальную поверхность; толщина слоя агарозного геля должна составлять $(1,0 \pm 0,1)$ мм. После застывания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет (рис. 1) и пробивают лунки стерильным пробойником диаметром 4 мм. Гель из лунок удаляют с помощью вакуумного насоса или стерильной иглы. После этого подготовленную пластинку помещают в прибор для горизонтального электрофореза.

В камеры прибора наливают 1,5 л электродного буферного раствора. Соединяют поверхность агарозного геля с буферным раствором с помощью 4-слойной фильтровальной бумаги размером 120×60 мм. Расстояние от края фильтровальной бумаги до лунок должно быть не менее 15 мм.

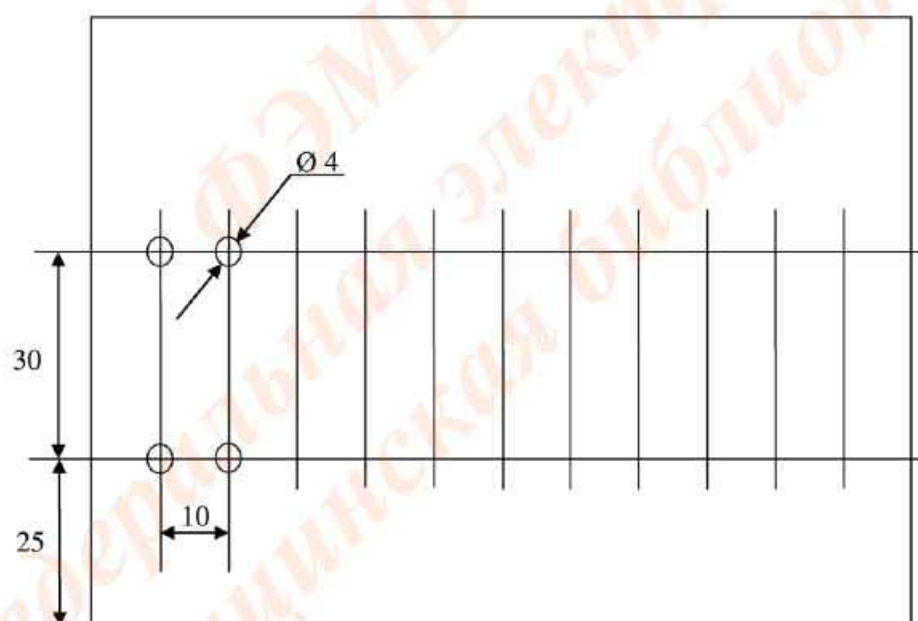


Рисунок 1—Трафарет для ракетного иммуноэлектрофореза
(размеры указаны в мм)

В лунки агарозного геля вносят по 15 мкл испытуемого образца и стандартного образца «Содержания бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочного графика». Испытуемый образец вносят в 2 лунки. При использовании анти-СРС сыворотки для выявления преципитата

БСА из испытуемого образца готовят 2 пробы: одна содержит воду очищенную, а вторая – БСА в конечной концентрации 2 мкг/мл.

Время от начала внесения образцов до включения прибора не должно превышать 10 мин.

Условия проведения электрофореза: напряжение– 6 - 8 В на 1 см длины геля, сила тока–6 мА, время – 18–20 ч. По окончании электрофореза пластинку помещают в кювету с 0,9 % раствором натрия хлорида и дважды промывают в течение 3 ч. После этого пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, предварительно смоченной водой, прокалывают иглой отверстия над лунками (для предотвращения растрескивания геля) и сушат при температуре 18–20 °С. После высушивания с пластинки удаляют фильтровальную бумагу путем смачивания водой и переносят в кювету с красителем на 15–20 мин. Затем окрашенную пластинку помещают в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей и выдерживают до достижения необходимой контрастности между преципитатом и фоном. Далее пластинку промывают водой и сушат при температуре 18–20 °С. С помощью металлической линейки измеряют высоту пика (h), длина шкалы до (300 ± 0,1) мм. Измерения делают от края лунки до максимума внешней высоты пика («ракеты») (рис. 2).

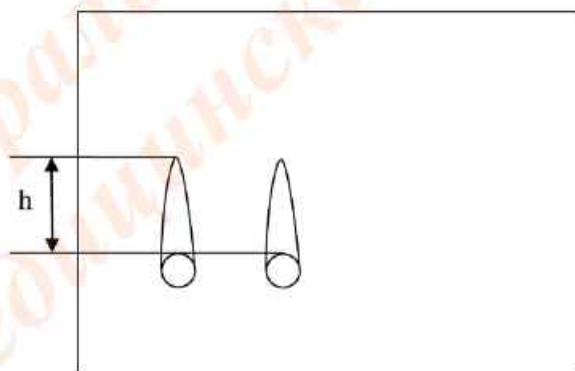


Рисунок 2. Измерение высоты пика «ракеты»

Содержание БСА в испытуемой пробе определяют по калибровочному графику. Оно должно находиться в диапазоне от 0,5 до 2,0 мкг/мл.

Построение калибровочного графика. СО «Содержания бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочного графика» разводят в соответствии с инструкцией по применению до концентрации 2,0 мкг/мл. К 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 мл разведенного стандартного образца прибавляют воду до 0,4 мл (концентрация БСА – 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 мкг/мл соответственно). Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество БСА в СО, в мкг/мл, а по оси ординат – высоту пика в мм. Калибровочный график должен проходить через начало координат.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый образец – 15 мкл испытуемого образца.
2. Получение сыворотки против БСА. Кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3,5 кг иммунизируют 0,15 % раствором БСА. Используют БСА с содержанием белка не менее 95 %.

Приготовление 0,15 % раствора БСА. 0,15 г БСА помещают в градуированный цилиндр вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

I цикл иммунизации состоит из 2 инъекций 0,15 % раствора БСА с интервалом 7 сут в дозе 1,0 мл в смеси с 1,0 мл адьюванта Фрейнда в область подколенных лимфатических узлов (последовательно в правую и левую лапу).

II цикл иммунизации проводят через 30 сут после I цикла: делают 5 внутрибрюшинных инъекций БСА с интервалом 2 сут в возрастающих дозах: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мл (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация – 0,1 мл 0,15% раствора БСА подкожно).

III цикл иммунизации проводят через 30 сут после цикла II иммунизации, и он состоит из 3 внутривенных инъекций с интервалом 2 сут в возрастающих объемах: 0,5; 1,0; 1,5 мл 0,15 % раствора БСА (за 1 ч до первой инъекции проводится десенсибилизация – 0,1 мл раствора БСА подкожно).

Через 7 сут после последнего введения БСА у кроликов берут 2–3 мл крови и в сыворотке определяют титр антител против БСА методом ракетного иммуноэлектрофореза (отмечают разведение сыворотки, дающее пик высотой 1 мм с раствором БСА в концентрации 0,5 мкг/кг). Сыворотка, имеющая титр не ниже 1:500, годна к дальнейшему использованию в этом случае кроликов обескровливают тотально.

Если титр сыворотки ниже 1:500, через 30 сут проводят *IV цикл иммунизации* (аналогичный третьему циклу), через 7 сут кроликов

обескровливают тотально и устанавливают титр антител против БСА. Сыворотка, имеющая титр ниже 1:500, подлежит уничтожению.

При обескровливании кроликов кровь от каждого из них собирают в отдельный флакон. Флаконы с кровью ставят в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 60–65 мин, затем обводят образовавшийся сгусток пипеткой и оставляют при температуре $4 - 8^\circ\text{C}$ на 18–20 ч. После этого сыворотку отбирают в стерильную посуду, прибавляют борную кислоту из расчета 20 – 25 мг на 100 мл сыворотки и разливают по 0,5 мл в ампулы из стекла НС-1. Ампулы запаивают и хранят при температуре минус $19-21^\circ\text{C}$ в течение 2 лет.

3. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) (рН 8,6 – 8,8). В мерном цилиндре вместимостью 1000 мл последовательно растворяют в воде очищенной 6,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, 6,0 г натрия эдетата (трилон Б) и 19,0 г борной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. При необходимости полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. Раствор хранят при температуре $2 - 8^\circ\text{C}$ не более 3 мес.

4. Приготовление электродного буферного раствора (рН 8,6 – 8,8). К 300 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) (рН 8,6 – 8,8) прибавляют 1200 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при температуре $2 - 8^\circ\text{C}$ не более 1 мес при 4-кратном использовании.

5. Приготовление 1 % геля агарозы. В колбу вместимостью 100 мл помещают 1 г агарозы, прибавляют 80 мл воды очищенной и растворяют при нагревании на кипящей водяной бане, прибавляют 20 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора с натрия эдетатом (трилон Б) и вновь нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Гель агарозы разливают по 16 мл в химические пробирки вместимостью 20 мл и хранят при температуре $4 - 8^\circ\text{C}$ не более 2 мес.

6. Приготовление красителя. 0,5 г кислотного синего 92 растворяют в растворе, состоящем из 10 мл уксусной кислоты ледяной, 45 мл 96 % раствора спирта этилового и 45 мл воды очищенной. Раствор перемешивают, фильтруют и хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

7. Приготовление раствора для обесцвечивания. К 200 мл уксусной кислоты ледяной прибавляют 500 мл 96 % раствора спирта этилового, 300 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

8. Подготовка стеклянных пластинок. На стеклянные пластинки размером 120×90 мм, обработанные хромовой смесью, наносят 1 мл 1 % расплавленного геля, растирают по поверхности пластинки с помощью стеклянной палочки и подсушивают. Подготовку стеклянных пластинок проводят непосредственно перед использованием.

Изоэлектрическое фокусирование**ОФС.1.7.2.0021.15****Вводится впервые**

Метод изоэлектрического фокусирования используется для оценки генно-инженерных препаратов, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратов (содержание основного компонента не менее 95 %), предназначенных для применения в качестве лекарственных средств.

Электрофоретическое разделение белков методом изоэлектрического фокусирования происходит под действием электрического поля в градиенте pH в соответствии с их изоэлектрической точкой (pI). Местоположение каждого белка определяется значением его изоэлектрической точки. При достижении белком изоэлектрической точки в градиенте pH его суммарный заряд становится равным нулю и он перестает перемещаться в электрическом поле. В результате электрофоретического разделения исследуемого вещества может происходить диффузия белковых молекул из зоны фокусирования, но, попадая в более кислую или щелочную среду, молекулы белка будут терять нейтральность и под действием электрического поля снова возвращаться в зону изоэлектрической точки. Для создания градиента pH применяют смеси синтетических полиаминополикарбоновых кислот (амфолиты) в диапазоне изоэлектрических точек (pI) от 3,0 до 10,0 единиц pH. Смесь амфолитов помещают в стабилизационную среду (полиакриламидный или агарозный гель) и подают напряжение, в результате чего создается градиент, в котором pH увеличивается в направлении от анода (+) к катоду (-).

Для ускорения процесса фракционирования белков используют максимально допустимую напряженность электрического поля. Ограничением служит невозможность эффективного отвода выделяемого тепла. Использование тонких гелей и эффективного охлаждения пластинки с помощью водяного термостата предотвращает перегревание геля и способствует хорошему разделению белков.

Максимальное различие между значениями pI (ΔpI) компонентов, определяют по формуле:

$$\Delta pI = 3 \times \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E - \left(\frac{du}{dpH} \right)},}$$

где: D – коэффициент диффузии белка;

dpH/dx – градиент pH ;

E – напряженность электрического поля, выраженное в вольтах на сантиметр;

$(-du/dpH)$ – изменение подвижности вещества при изменении pH в области, близкой к pI .

Формула показывает, что хорошее разрешение может быть получено для веществ с низким коэффициентом диффузии и достаточно большим значением изменения подвижности в точке, близкой к изоэлектрической. Хорошему разрешению способствует высокая напряженность поля и плавный градиент pH . Разрешающая способность изоэлектрического фокусирования при использовании геля, приготовленного с применением амфолитов, составляет 0,02 единицы pH , а при использовании иммобилизованных гелей (с химически фиксированным градиентом pH) – около 0,001 единицы pH .

Испытанию подлежат субстанция и очищенный белок до добавления стабилизаторов, наполнителей, консервантов и других компонентов, входящих в состав лекарственной формы. Методика также может использоваться для анализа готовой продукции в сравнении со стандартным

образцом (стандартные образцы указываются в фармакопейной статье и нормативной документации).

Практические аспекты

Присутствие в генно-инженерных продуктах, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратах солей в высоких концентрациях (более 0,1М) может искажать градиент рН и форму сфокусированных белков. Для нейтрализации этого эффекта образцы лучше готовить в деионизованной воде, 1–2 % растворе глицина или амфолитов (амфолины, фармалиты, сервалиты, биолиты). При необходимости для пробоподготовки возможно использование специальных центрифужных концентраторов (фильтров), диализа или гель-фильтрации.

Время завершения процесса изофокусирования в полиакриламидных гелях, как правило, определяют по предварительно окрашенным стандартным белкам - маркерам (например, гемоглобину), нанесенным на гель в различные точки одновременно с исследуемыми образцами. Процесс считается завершенным в том случае, если все стандартные образцы образуют полосы в установленном месте. Если завершение процесса изофокусирования определяют по времени, прошедшему с момента нанесения образцов, установленное время должно быть обосновано.

Метод изоэлектрического фокусирования может быть применен:

- для подтверждения подлинности, когда подвижность испытуемого образца сравнима с подвижностью стандартного образца или маркера pI;
- для оценки примесей по интенсивности окрашивания полос относительно основных компонентов по сравнению со стандартным образцом;
- для количественного определения по интенсивности окраски полос с помощью денситометра или аналогичного оборудования.

Допустимое различие подвижности испытуемого и стандартного образцов при оценке подлинности должно быть указано в нормативной документации. Для количественного определения примеси или основного компонента должно быть предусмотрено применение контрольных образцов с концентрацией, соответствующей пределу количественного определения примеси.

Оборудование

Прибор для проведения изоэлектрофокусирования состоит из:

- высоковольтного источника питания с программой, специально разработанной для изоэлектрофокусирования в полиакриламидных гелях, с максимальным напряжением не менее 3000 В, током 300 мА и мощностью 300 Вт;
- электрофорезной камеры из жесткой пластмассы, содержащей охлаждающую пластину из соответствующего материала для поддержания геля;
- платиновых электродов, которые соединяются с гелем посредством электродных (бумажных или гелевых) полосок необходимой ширины, длины и толщины, пропитанных анодным и катодным буфером.

Изоэлектрофокусирование в полиакриламидных гелях

Форма для приготовления полиакриламидного геля состоит из двух стеклянных пластин, пластикового листа, прокладок (спейсеров) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

Для метода изоэлектрофокусирования используют гели с максимальной пористостью и достаточной механической прочностью. Эти свойства зависят от относительного содержания акриламида и бисакриламида (используемые для сшивки гелей).

Поскольку молекулярная масса большинства известных белков не превышает 200000 Да возможно использование 7,5% гелей.

Примечания.

1. Приготовление основного 30 % раствора акриламида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 29,1 г акриламида и 0,9 г метиленбисакриламида, прибавляют 70 мл воды деионизованной, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора деионизованной водой до метки и вновь перемешивают. Далее раствор фильтруют (условия фильтрования указывают в нормативной документации). Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в емкости из темного стекла в течение 1 мес.

2. Приготовление полиакриламидного геля. Смешивают основной 30 % раствор акриламида со смесью амфолитов в соотношении, указанном в нормативной документации, и осторожно перемешивают.

Подготовленный раствор акриламида с амфолитами помещают на магнитную мешалку, прибавляют 0,25 объема 10 % раствора аммония персульфата, 0,25 объема раствора ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамина) и перемешивают. Заливают полученный раствор в подготовленную форму. Полимеризация геля происходит в течение 30-40 мин.

Сборка формы для полиакриламидного геля

На нижнюю стеклянную пластину помещают пластиковый лист, на него помещают прокладки (спейсеры) и сверху помещают вторую стеклянную пластину, и всю конструкцию скрепляют зажимами.

Методика проведения изоэлектрофокусирования

Охлаждающую пластину помещают в камеру для электрофореза, соединяют с термостатом, установленным на температуру от 8 до 10 °С. На охлаждающую пластину наносят 1,0 мл воды деионизованной или керосина.

Форму разбирают, гель на полиэфирной пленке (пластиковом листе) переносят на охлаждающую пластину таким образом, чтобы вода касалась всего края геля. Гель медленно и осторожно помещают на охлаждающую пластину, избегая появления пузырьков воздуха. Одну электродную полосу смачивают анодным буферным раствором и помещают на анодный конец геля (маркировка (+) на охлаждающей пластине). Вторую электродную полосу смачивают катодным буферным раствором и помещают на катодный конец геля (маркировка (-) на охлаждающей пластине). Составы катодного и

анодного буферных растворов приводят в нормативной документации. Аппликаторы для нанесения испытуемых и стандартных образцов помещают на поверхность геля, наносят необходимое количество испытуемых и стандартных образцов, указанное в нормативной документации (при использовании метода для оценки чистоты, количество наносимого образца должно обеспечивать выявление 1 % примеси). Для калибровки геля наносят растворы белков (маркеры) с известными величинами изоэлектрических точек (коммерческие наборы маркеров с диапазоном изоэлектрических точек 3–10; 2,5–6,5; 5–10,5 или с маркерами, указанными в фармакопейных статьях). Вместо бумажных аппликаторных полосок возможно использование геля с лунками для проб.

Держатель электродов помещают в электрофоретическую камеру и устанавливают электроды вдоль центров электродных полосок на поверхности геля. Соединяют электроды с основной частью камеры и закрывают ее крышкой. Подключают камеру к источнику питания (тока). Условия изоэлектрического фокусирования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

После окончания электрофореза отключают источник питания, снимают крышку прибора, убирают электроды. Аккуратно, пинцетом удаляют электродные полоски и аппликаторы с геля. Гель немедленно переносят в емкость с фиксирующим раствором и выдерживают при покачивании, затем фиксирующий раствор удаляют. Гель промывают трижды деионизованной водой, прибавляют окрашивающий раствор Кумасси R-250 или G-250, состав и приготовление которых указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. При окраске Кумасси R-250 гель отмывают в 25 % растворе этанола и 8 % растворе уксусной кислоты, а при окраске Кумасси G-250 – в деионизованной воде. Отмывку проводят до тех пор, пока на прозрачном фоне не станут четко видны полосы после изоэлектрофокусирования.

Для окраски геля возможно применение раствора серебра нитрата, приготовление которого, а также условия отмывания, описывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Время выдерживания геля в фиксирующем, окрашивающем растворах, время отмывания геля и регистрация положения и интенсивности полос должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечания.

1. Приготовление растворов. Описание приготовления растворов 10 % раствора аммония персульфата, раствора ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин); фиксирующего раствора, 25 % раствора спирта этилового и 8 % раствора уксусной кислоты указано в ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

2. Особенности методики, требующие внимания. Исследуемые образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для защиты белков от экстремальных величин pH пробы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. При валидации метода пробы могут быть нанесены на гель в трех позициях: посередине геля и на его концах. Следует не допускать слишком длительное фокусирование, т.к. в геле может возникнуть процесс, называемый катодным дрейфом, при котором с течением времени градиент pH разрушается. Причины данного явления не до конца изучены. Одними из факторов могут быть электроэндоосмос и абсорбция диоксида углерода. Катодный дрейф наблюдается в виде миграции сфокусированной белковой полосы от катодного конца геля. Для решения этой проблемы могут быть использованы иммобилизованные гели.

Во время фокусирования необходимо обеспечить эффективное охлаждение пластины, на которую помещен гель, при температуре от 8 до 10 °C. Высокое напряжение электрического поля, используемого при изоэлектрическом фокусировании, может привести к перегреванию и влиять на качество разделения.

Особенности методики, требующие внимания, должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Возможные модификации методики

Особенности некоторых исследуемых веществ могут потребовать внесения следующих изменений в методику:

- из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения в состав геля вводят мочевины. Допускается добавление в гель от 3М до 9М растворов мочевины. Для предотвращения карбомоилирования белка следует добавлять только свежеприготовленные растворы мочевины;

- добавление в гель детергентов: неионных (например, октилглюкозид, Тритон X-100 или Nonidet P-40 (NP-40)) или цвиттерионных (например, 3-3((3-холамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфонат – CHAPS или 3-3((3-холамидопропил)диметиламмоний-2-гидрокси-1-пропансульфонат – CHAPSO);

- добавление амфолита к исследуемому образцу для предотвращения агрегации и преципитации белков;

- использование альтернативных методов детекции.

Модификации методики должны быть обоснованы и отражены в фармакопейной статье или нормативной документации.

Критерии пригодности системы

Результаты изоэлектрического разделения могут учитываться, если электрофореграммы удовлетворяют следующим критериям:

- формирование стабильного градиента pH с необходимыми (требуемыми, заданными) характеристиками, оцениваемого, например, с использованием маркеров pI (стандартных образцов) с известными величинами изоэлектрических точек, в том числе, предварительно окрашенных;

- другие обоснованные критерии приемлемости результатов (например, разделение двух выбранных белков или компонентов одного белка).

Критерии приемлемости результатов

- совпадение электрофореграммы исследуемого образца с электрофореграммой образца сравнения, например, соответствующего стандартного образца на основе очищенного белка (субстанции);
- выявление образца в минимально установленной концентрации.

Для оценки генно-инженерных продуктов, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратов, можно использовать методику изоэлектрического фокусирования с подтвержденными валидационными характеристиками.

Особенности валидации методики

При использовании методики для оценки подлинности необходимо обосновать критерии приемлемости результатов. При использовании стандартного образца на основе очищенного белка аттестуемая характеристика должна быть научно обоснована, стандартный образец должен быть аттестован в установленном порядке.

При использовании методики для оценки чистоты препарата необходимо представить данные, обосновывающие предел обнаружения примеси, а также минимальную разницу в pI компонентов, которую выявляет методика (разрешающая способность). При количественном определении – представить данные, обосновывающие предел количественного определения примеси, минимальную разницу в pI компонентов, которую выявляет методика, линейный диапазон при определении основного компонента, воспроизводимость методики. Целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка с научно обоснованной аттестуемой характеристикой.

При внесении изменений в методику изоэлектрического фокусирования должны быть подтверждены валидационные характеристики ранее утвержденной методики. Валидации подлежат следующие изменения:

- использование коммерческих готовых гелей (precast gels), наборов для окрашивания и обесцвечивающих растворов;
- использование гелей с иммобилизованным градиентом pH;
- использование гелей с пластиковыми аппликаторами для нанесения образцов;
- использование кассет с гелем различных размеров, включая ультратонкие (0,2 мм) гели;
- использование различных объемов проб, электродных полосок и аппликаторов, изготовленных не из бумаги;
- изменение условий проведения изоэлектрического фокусирования, включая изменения напряжения, размера геля и используемого оборудования, использование фиксированного времени разделения вместо слежения за достижением определенной точки выбранного маркера pI;
- использование автоматизированного оборудования;
- замена полиакриламидных гелей на агарозные.

**Определение подлинности и чистоты
иммунобиологических лекарственных
препаратов методом вестерн-блот**

ОФС.1.7.2.0022.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод вестерн-блот, один из вариантов иммуноблоттинга, который используют для оценки подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) на основе высокоочищенных белков, в том числе, полученных по технологии рекомбинантной ДНК.

На первом этапе проводят электрофорез в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом (так называемый, SDS-PAGE электрофорез) для разделения белков. Затем белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану или PVDF-мембрану (мембрана из поливинилденфторида). Детекцию проводят с помощью специфичных к определяемому белку антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена (прямой вариант ИФА), или последовательно с помощью первых антител к определяемому белку, и вторых антител (так называемой, антиглобулиновой сыворотки), специфичных к иммуноглобулину первых антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена (непрямой вариант ИФА).

В данной ОФС изложен метод детекции на основе цветной реакции, как один из наиболее широко применяемых в настоящее время. Для детекции также могут быть использованы хемилюминесцентный метод, в том числе, с

усилением хемилюминесценции, и методы радиоактивной или флуоресцентной меток (РИА или РИФ).

Испытание проводят с фармацевтическими субстанциями или с готовой продукцией.

При оценке подлинности, на этапе выполнения электрофореза, помимо испытываемых образцов, должно быть предусмотрено внесение в лунки геля следующих растворов: отрицательный контрольный образец (1-кратный буфер для приготовления образцов), смесь маркеров молекулярных масс (рекомендуется использование предварительно окрашенных маркеров молекулярных масс), стандартный образец испытываемого белка (при его наличии), аттестованный в установленном порядке. При оценке чистоты (примесей) дополнительно должно быть предусмотрено внесение образца с концентрацией белка, соответствующей пределу обнаружения или количественного определения примеси (в зависимости от назначения методики) и установленной на основании результатов валидации методики. При оценке чистоты необходимо сравнение результатов блота с результатами электрофореза в полиакриламидном геле; методика должна выявлять 1 % примеси.

Методика

Для разделения белков по их молекулярным массам предварительно проводят электрофорез в соответствии с методикой, изложенной в ОФС «Электрофорез» и ОФС «Электрофорез в полиакриламидных гелях».

Для проведения переноса белков используют прибор для переноса белков. Все работы проводят в резиновых перчатках. Объем всех используемых растворов должен быть достаточен для полного погружения мембраны, на которую переносят белки.

После проведения электрофореза для подготовки геля к иммуноблотингу, его заливают буферным раствором для переноса белков (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации), ставят на орбитальный шейкер и выдерживают в течение 10-

15 мин. Затем подготавливают лист нитроцеллюлозной или PVDF-мембраны, соответствующий размеру геля. При использовании нитроцеллюлозной мембраны лист выдерживают 5 мин в деионизованной воде, а затем 5 мин в буферном растворе для переноса белков (если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). При использовании PVDF-мембраны ее необходимо выдержать в растворе метанола или спирта в течение 10-15 мин, а затем произвести аналогичные действия, что и для нитроцеллюлозной мембраны.

Для переноса белков на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану собирают "сэндвич". Для этого специальную губку, входящую в комплект прибора для переноса белков, смачивают в буферном растворе для переноса белков и помещают на специальную пластиковую рамку, на которую затем помещают от одного до трех листов фильтровальной бумаги (например, Whatman 3MM), предварительно обрезанных в соответствии с размером мембраны и смоченных в растворе для переноса белков. Сверху помещают гель, на поверхность которого аккуратно (без пузырьков воздуха) помещают приготовленный лист нитроцеллюлозной или PVDF-мембраны. На мембрану помещают от одного до трех листов фильтровальной бумаги, предварительно смоченных в растворе для переноса белков, и сверху прикрывают второй специальной губкой, смоченной в растворе для переноса белков. Рамку скрепляют зажимами и медленно погружают в прибор для электрофореза, заполненный раствором для переноса белков, лист мембраны должен быть обращен к аноду. Включают прибор. Электрофоретический перенос белков осуществляют при комнатной температуре в течение 25 мин, выставив ограничение по току из расчета $A_{\max} = 2 \text{ мА/см}^2$, (например, для геля размером $10 \times 10 \text{ см}^2$ $A_{\max} = 200 \text{ мА}$), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Допускается использование оборудования для полусухого переноса белков с геля на мембрану в соответствии с инструкцией по его применению.

По окончании переноса "сэндвич" разбирают. Мембрану промывают фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ).

Оценивают полноту переноса белков визуалью по переносу окрашенных маркеров молекулярных масс, все основные белковые полосы которого должны быть выявлены на мембране.

Детекция

Для детекции результатов метода вестерн-блот проводят обработку (гибридизацию) исследуемого препарата антителами. Для этого мембрану с перенесенными на нее белками помещают в контейнер с блокирующим буферным раствором и инкубируют на орбитальном шейкере в течение 30 – 60 мин (если не предусмотрено иное в фармакопейной статье или нормативной документации) для предотвращения неспецифической сорбции антител на мембране.

После этого промывают мембрану в буферном растворе для отмывки трижды по 5 мин, если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Затем мембрану обрабатывают раствором первых антител к анализируемому белку, приготовленным с использованием буферного раствора для антител (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации) непосредственно перед использованием в соответствии с инструкцией по применению. Обработку антителами проводят при комнатной температуре в течение 30 – 60 мин (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Далее трижды по 5 мин проводят отмывку мембраны буферным раствором от несвязавшихся антител на орбитальном шейкере при комнатной температуре, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

После отмывки мембраны, проводят обработку (гибридизацию) раствором вторых антител. В качестве вторых антител используют поликлональные антитела к иммуноглобулинам того вида животного,

которое использовалось для получения первых антител. Данные антитела конъюгированы с ферментом (пероксидаза из корней хрена или щелочная фосфатаза). Для выполнения этого этапа повторяют процедуру, описанную выше, заменив раствор первых антител раствором вторых антител. Затем проводят аналогичную первой отмывку мембраны от несвязавшихся вторых антител.

Проявление картины иммуноблота на мембране проводят раствором тетраметилбензидинового субстрата (TMB) для антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, или раствором для проявления щелочной фосфатазы – при использовании антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Реакцию останавливают, промывая блот деионизованной водой. С поверхности мембраны удаляют излишек воды фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе в темном месте.

Оценка результатов

При оценке подлинности основные окрашенные полосы на проявленной мембране должны соответствовать основным окрашенным полосам на электрофореграмме.

Количество анализируемого вещества и содержание примесей, а также их соотношение оценивают денситометрически.

Содержание примеси, не выявляемой в блоте, не должно превышать величины, установленной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Критерии пригодности системы

Результаты метода вестер-блот могут учитываться, если:

- маркеры молекулярных масс распределены равномерно по всей длине соответствующей дорожки геля;

- на блоте видны все основные полосы, выявленные при окрашивании геля Кумасси ярко-голубым R-250 или G-250;
- выявляется образец с минимальной концентрацией, установленной в фармакопейной статье или нормативной документации

Критерии приемлемости результатов

- Совпадение блота исследуемого образца с блотом образца сравнения, например, соответствующего стандартного образца на основе очищенного белка (субстанции);
- соответствие молекулярной массы основного выявленного компонента требованиям спецификации;
- соответствие содержания выявляемой примеси в стандартном образце диапазону, установленному в свидетельстве на стандартный образец.

Методику определения подлинности и чистоты методом вестерн – блот следует использовать с подтвержденными валидационными характеристиками в отношении специфичности и предела обнаружения примеси.

Особенности валидации методики

При использовании методики для оценки подлинности необходимо обосновать критерии приемлемости результатов; целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка, аттестованного в установленном порядке.

При использовании методики для оценки чистоты необходимо обосновывать предел обнаружения примеси. При количественном определении необходимо обосновать предел количественного определения примеси, указать линейный диапазон при определении основного компонента и примесей, прецизионность и правильность методики. Для этого целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка. При внесении изменений в методику, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, должны быть подтверждены

валидационные характеристики ранее утвержденной методики. Валидации подлежат следующие изменения:

- использование различного количества наносимых на гель проб;
- изменение условий переноса белков с геля на мембрану, включая изменение используемого оборудования;
- изменения состава буферных растворов;
- изменение способа детекции исследуемого вещества.

Примечания.

1. Буферный раствор для переноса белков pH 8,3. Если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, используют один из описанных ниже способов приготовления растворов (см. Вариант 1 и Вариант 2). Раствор для переноса можно использовать 2-3 раза. Раствор хранят в течение 6 мес при температуре от 4 до 8 °С.

Вариант 1. В градуированный химический стакан вместимостью 3000 мл помещают 7,86 г трис(гидроксиметил)аминометана, 33,75 г глицина, добавляют до 2400,0 мл деионизованной воды и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Измеряют pH, который должен быть равен 8,3 – 8,4 (доводить pH раствора кислотой или щелочью не допускается). Добавляют 600,0 мл спирта и перемешивают.

Вариант 2. В градуированный химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 5,8 г трис(гидроксиметил)аминометана, 2,9 г глицина, 11,55 мл 10 % раствора натрия додецилсульфата, добавляют 800,0 мл деионизованной воды и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения, измеряют pH (8,3-8,4). Добавляют 200,0 мл 100 % метанола и перемешивают. Если используется PVDF-мембрана, то натрия додецилсульфат из буферного раствора исключают, а количество спирта уменьшают до 100,0 мл, увеличивая тем самым объем добавляемой воды до 900,0 мл.

2. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), pH 7,2 (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). В градуированную емкость наливают 4500,0 мл деионизованной воды и последовательно прибавляют: 40,0 г натрия хлорида, 1,0 г калия хлорида 5,75 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 2х-водного, 1,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного (каждую следующую соль прибавляют после полного растворения предыдущей). Устанавливают pH до 7,2 раствором 70 % ортофосфорной кислоты или раствором 45% натрия гидроксида. Доводят объем до 5000,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят в течение 3 мес при температуре 4 - 8 °С.

3. Буферный раствор для отмывки. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 5,0 мл 10 % раствора твин-20, доводят объем раствора до метки с помощью ФСБ и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 4 °С до 8 °С.

4. Блокирующий буферный раствор. К 100,0 мл буферного раствора для отмывки прибавляют 5,0 мг бычьего сывороточного альбумина (или другого белка), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и перемешивают до полного растворения. Раствор готовят перед использованием.

5. Буферный раствор для антител. К 100,0 мл буферного раствора для отмывки прибавляют 2,0 мг бычьего сывороточного альбумина (или других белков), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и перемешивают до полного растворения. Раствор готовят перед использованием.

6. Раствор ТМВ – раствор для проявления пероксидазы хрена. Используют ТМВ-субстрат, готовый к применению.

7. Раствор для проявления щелочной фосфатазы. Растворяют 1 таблетку субстрата BCIP/NBT в 10,0 мл деионизованной воды. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Определение белка	ОФС.1.7.2.0023.15
колориметрическим методом	
(метод Лоури) в	
иммунобиологических	
лекарственных препаратах	Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья предназначена для определения белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах с использованием стандартного образца. Общие принципы метода, требования к стандартному, контрольному и испытываемому образцам изложены в ОФС «Определение белка».

Для определения белка в иммунобиологических лекарственных препаратах применяют следующие модификации метода Лоури:

- метод без предварительного осаждения белка (Метод I) для определения содержания белка от 0,04 до 0,16 мг/мл;
- метод с предварительным осаждением белка (Метод II) для определения содержания белка от 0,1 до 0,13 мг/мл;
- метод для сорбированных препаратов (Метод III) для определения содержания белка от 0,02 до 0,16 мг/мл;
- метод для сорбированных препаратов (Метод IV) для определения содержания белка от 0,01 до 0,02 мг/мл.

Метод I (без предварительного осаждения белка)

Метод рекомендован для определения белка в химических вакцинах и иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП), в составе которых отсутствуют компоненты, влияющие на результаты анализа.

Определение белка без предварительного осаждения проводят в соответствии с методикой, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А). В качестве контрольного раствора используют 1 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание белка в препарате рассчитывают по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. К 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 мл стандартного раствора, добавляют воду очищенную до 1 мл (концентрация белка: 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 мг/мл соответственно), перемешивают и далее проводят определение по методу А (без предварительного осаждения белка) в соответствии с ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).

Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белка в мг, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,04 до 0,16 мг/мл белка.

2. Стандартный раствор^{*}. Стандартный образец (СО) с аттестованным значением содержания белка разводят до концентрации 0,2 мг/мл в соответствии с инструкцией по применению.

^{*}В случае отсутствия СО, стандартный раствор может быть приготовлен, как указано в ОФС «Определение белка».

Метод II (с предварительным осаждением белка)

Метод рекомендован для ИЛП, содержащих компоненты, влияющие на результаты анализа (тиомерсал, ароматические аминокислоты, сахара и т.п.)

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают на вихревой мешалке. Пробу выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18 - 20 ч. Осадок отделяют центрифугированием при температуре 4 - 8 °С при 2000 об/мин в течение 30 мин, промывают 1 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и

центрифугируют в аналогичных условиях. Надосадочную жидкость удаляют, осадок растворяют в 0,2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, доводят объем раствора водой до 1 мл и перемешивают. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл воды очищенной, перемешивают на вихревой мешалке, прибавляют 5 мл реактива В, вновь перемешивают на вихревой мешалке и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее анализ проводят по методу В в соответствии с ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод В).

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,1 до 0,13 мг/мл белка.
2. Приготовление реактива В указано в ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).
3. Приготовление 10 % и 20 % растворов трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворы готовят соответствующим разведением 80 % раствора ТХУ.
4. Приготовление 80 % раствора (ТХУ). Растворяют 150 г ТХУ в 100 мл воды очищенной. Титруют 1 мл полученного раствора 1 М раствором натрия гидроксида, (индикатор фенолфталеин).

Концентрацию ТХУ (Х), выраженную в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X = a \cdot 0,1634 \cdot 100 = a \cdot 16,34,$$

где: а - объем 1М раствора натрия гидроксида, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл;

0,1634 - количество ТХУ, соответствующее 1 мл 1 М раствора натрия гидроксида, г.

Раствор ТХУ разводят в соответствии с полученными данными до концентрации 80 %. Титр раствора проверяют не реже 1 раза в мес. При изменении установленной концентрации раствор готовят заново.

5. Приготовление фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Перед использованием 2 N фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив (2 N коммерческий реактив Фолина) разводят в 2 раза водой очищенной или готовят реактив в соответствии с ОФС «Реактивы. Индикаторы».

Метод III (для сорбированных препаратов с содержанием белка 0,02 - 0,16 мг/мл)

В центрифужную пробирку отбирают 1 или 2 мл испытуемого раствора, тщательно перемешанного на вихревой мешалке, центрифугируют

при температуре 4-5 °С при 3500 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок промывают 2 мл воды очищенной и вновь центрифугируют в тех же условиях, после чего надосадочную жидкость вновь сливают.

К осадку прибавляют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают, выдерживают 30 мин при комнатной температуре, затем прибавляют 5 мл реактива В и снова перемешивают. Через 10 мин прибавляют 0,5 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Смесь перемешивают и центрифугируют при температуре 4 - 5 °С при 3500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и через 10 мин измеряют оптическую плотность по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А).

В качестве контрольного раствора используют 1 или 2 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, прибавляют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 5 мл реактива В и 0,5 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива.

Содержания белка рассчитывают по калибровочному графику, как указано в методе I. Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащего от 0,04 до 0,16 мг/мл белка или 2 мл испытуемого раствора, содержащего от 0,02 мг/мл до 0,04 мг/мл белка.
2. Приготовление стандартного раствора – указано в методе I.

Метод IV (для сорбированных препаратов с содержанием белка 0,01 - 0,02 мг/мл)

2 мл испытуемого раствора центрифугируют при 3500 об/мин при температуре 4 – 5 °С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют,

осадок промывают 2 мл воды очищенной и центрифугируют в тех же условиях. Затем надосадочную жидкость вновь удаляют.

К осадку прибавляют 0,4 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем прибавляют 2 мл реактива В и вновь перемешивают. Через 10 мин прибавляют 0,2 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Смесь перемешивают и центрифугируют при температуре 4 – 5 °С при 3500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и через 10 мин измеряют оптическую плотность по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (метод Лоури, метод А).

В качестве контрольного раствора используют 2 мл воды очищенной или буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, прибавляют 0,4 мл 0,1М раствора натрия гидроксида, 2 мл реактива В и 0,2 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива.

Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, как указано в методе I.

Построение калибровочного графика. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мл, (концентрация белка: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 мг/мл соответственно) добавляют воду очищенную до объема 0,4 мл перемешивают, добавляют 2,0 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива и вновь перемешивают. Далее определение проводят по методике, указанной в ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, Метод А).

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 2 мл испытуемого раствора с содержанием белка от 0,01 до 0,02 мг/мл.
2. Приготовление стандартного раствора указано в методе I. При определении белка в сорбированных препаратах в фармакопейной статье или в нормативной документации может быть указан коэффициент, учитывающий не полную десорбцию белка.

В случае, если в исходном препарате содержание белка выше, чем указано в методах I, II и III, его предварительно разводят до необходимой

концентрации. Способ разведения и растворитель указывают в нормативной документации. При вычислении конечного результата учитывают степень разведения.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Количественное определение
формальдегида
в иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0024.15

Взамен ГФ Х

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на образовании хиноидного красителя при взаимодействии фуксинсернистого реактива с водорастворимыми альдегидами. Определение формальдегида проводится колориметрическим методом с использованием фуксинсернистой кислоты.

Колориметрический метод

В химические пробирки отбирают 0,5 – 2,0 мл надосадочной жидкости сорбированного образца или такое же количество несорбированного образца, доводят объем раствора водой очищенной до 5 мл и перемешивают, затем прибавляют 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты и вновь перемешивают (испытываемый образец сорбированного лекарственного препарата предварительно центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин). Пробирки закрывают пробками и оставляют на 1 ч. Измеряют оптическую плотность при 590 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 5 мл воды очищенной и 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты.

Содержание формальдегида (X_1) в мкг/мл вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{a}{A},$$

где: а – содержание формальдегида, найденное по калибровочному графику, мкг;

А – объем испытуемого образца, мл.

Содержание формальдегида в ИЛП не должно превышать 0,02 % (200 мкг/мл).

Построение калибровочного графика. К 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 мл стандартного раствора № 2 прибавляют воду очищенную до объема 5 мл, перемешивают (содержание формальдегида: 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 мкг), прибавляют 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты и вновь перемешивают. Далее анализ проводят, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество формальдегида в мкг, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности калибровочных растворов.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. На анализ отбирают 0,5, 1,0 или 2,0 мл испытуемого образца в зависимости от содержания формальдегида в лекарственном препарате (количество формальдегида в анализируемом образце должно быть в пределах 20 – 80 мкг).

2. Основной стандартный раствор формальдегида с содержанием формальдегида около 4 мг/мл (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл формалина технического, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Определяют процентное содержание формальдегида в формалине техническом. В колбу с притертой пробкой переносят 5 мл раствора № 1, прибавляют 20 мл 0,05 М раствора йода и 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают и оставляют в темном месте на 10 мин. Затем прибавляют 11 мл 0,5 М раствора серной кислоты. Выделившийся йод титруют 0,1N раствором натрия тиосульфата. После появления соломенно-желтого окрашивания раствора добавляют 0,5 % раствор крахмала (индикатор) и продолжают титрование до обесцвечивания раствора. На титрование контрольного раствора отбирают 5 мл воды очищенной и прибавляют реактивы, указанные выше для раствора № 1.

Содержание формальдегида (X_2) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X_2 = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 0,001501 \cdot 100 \cdot 100}{5,0}$$

где: а – объем 0,1N раствора натрия тиосульфата, пошедшее на титрование контрольного раствора, мл;

б – объем 0,1 N раствора натрия тиосульфата, пошедшее на титрование раствора № 1, мл;

К – поправка к титру 0,1 N раствора натрия тиосульфата;

5,0 – объем раствора № 1, мл;

100 * – разведение формалина технического; мл

100 – коэффициент пересчета в проценты;

0,001501 – количество формальдегида, соответствующее 1 мл 0,05 М раствора йода, г.

Содержание формальдегида в формалине техническом должно быть не менее 36%.

Содержания формальдегида (X_3) в стандартном растворе № 1 в мг/мл рассчитывают по формуле:

$$X_3 = \frac{X_2 \cdot 1000}{100 \cdot 100 *},$$

где: X_2 – содержание формальдегида в формалине техническом, %;

100 – пересчет % в г;

100* – пересчет в 1 мл;

1000 – пересчет в мг.

Полученный раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

3. Стандартный раствор формальдегида 20 мкг/мл (раствор № 2). Необходимое количество раствора №1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (если установлено, что концентрация формальдегида в формалине техническом 37 %, то для приготовления стандартного раствора формальдегида № 2 отбирают 0,54 мл основного стандартного раствора № 1). Стандартный раствор № 2 используют свежеприготовленным.

4. Приготовление раствора фуксинсернистой кислоты. На кипящей водяной бане растворяют 1 г фуксина основного или парафуксина (для фуксинсернистой кислоты) в 500 мл воды очищенной. Раствор охлаждают до температуры 18 – 20 °С, фильтруют в мерную колбу, вместимостью 1000 мл и прибавляют 30 мл 20 % раствора калия метабисульфита или 25 мл 20 % раствора натрия метабисульфита. Через 20 мин к смеси прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и выдерживают не менее суток.

Перед каждым использованием раствор фуксинсернистой кислоты титруют 0,05 М раствором йода (индикатор: 0,5 % раствор крахмала). На титрование 3 мл фуксинсернистой кислоты должно расходоваться от 3 до

4 мл раствора йода. Если объем раствора йода, израсходованного на титрование, меньше 3 мл, то к 100 мл приготовленного реактива прибавляют калий (или натрий) метабисульфит из расчета 200 мг на каждый миллилитр разницы между 3 мл и израсходованным объемом раствора йода. Если объем раствора йода, израсходованный на титрование, больше 4 мл, то к 100 мл реактива прибавляют раствор фуксина основного или парафуксина (V_1) в мл в количестве, рассчитанным по формуле:

$$V_1 = \frac{V + 100}{27},$$

где: V – объем 0,05 М раствора йода, пошедший на титрование 3 мл реактива, мл;

100 – объем фуксинсернистой кислоты, мл;

27 – коэффициент пересчета.

Реактив готов к применению через сутки после приготовления. Раствор должен быть бесцветным, допускается слегка желтоватая окраска. Для его осветления раствора возможно применение активированного угля.

Реактив хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 1 г.

5. Приготовление 0,1 N раствора натрия тиосульфата. Раствор натрия тиосульфата готовят из стандарт-титра (фиксанала) 0,1М раствора натрия тиосульфата в мерной колбе вместимостью 1000 мл. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 3 мес.

6. Приготовление 20 % раствора натрия (калия) метабисульфита. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 20 г натрия (калия) метабисульфита, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Реактив хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 6 мес.

Количественное определение	ОФС.1.7.2.0025.15
тиомерсала в иммунобиологических	Взамен ГФ X
лекарственных препаратах	

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП) колориметрическим, полярографическим методом и методом электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии. Указанные методы предназначены для определения содержания тиомерсала в сорбированных и несорбированных ИЛП.

Колориметрический метод основан на выделении из тиомерсала ртути в виде свободных ионов и последующем колориметрическом определении ртути дитизоната.

Полярографический метод основан на полярографической активности тиомерсала.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (ЭААС) для определения тиомерсала в ИЛП вводится впервые. Метод основан на измерении оптической плотности атомного пара ртути получаемого при электротермической атомизации исследуемого образца. Сигнал максимального поглощения резонансового излучения атомами ртути прямо пропорционален концентрации тиомерсала в исследуемом образце. Содержание тиомерсала в испытуемом образце определяется по калибровочному графику.

Содержание тиомерсала в ИЛП не должно превышать 20-120 мкг/мл.

Колориметрический метод

Испытуемый образец помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 1,2 мл серной кислоты разведенной концентрированной (при наличии сорбента алюминия гидроксида смесь осторожно нагревают на водяной бане, постоянно помешивая до его полного растворения), добавляют 5 мл 5 % раствора калия перманганата, перемешивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. После этого удаляют избыток калия перманганата, прибавляя 1,5 мл 20 % раствора гидроксилamina сульфата, 30 мл воды очищенной и 5 мл 6 М раствора уксусной кислоты. Полученный раствор перемешивают, прибавляют 10 мл 0,001 % раствора дитизона (точно отмеренный объем) и встряхивают в течение 30 с. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения слоев фильтруют в кювету толщиной 10 мм нижний хлороформный слой через предварительно прокипяченную и высушенную вату. Затем измеряют оптическую плотность хлороформного раствора при 597 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 0,2 мл воды очищенной и все вышеперечисленные реагенты.

Содержание тиомерсала (X_1) в растворе в мкг/мл вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{a \cdot 100}{0,2 \cdot 49,55} = a \cdot 10,1$$

где: a – количество ртути, найденное по калибровочному графику, мкг;

100 – разведение испытуемого образца;

0,2 – объем испытуемого образца, мл;

49,55 – коэффициент пересчета ртути на тиомерсал.

Построение калибровочного графика. К 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мл стандартного раствора № 2 прибавляют 1,2 мл серной кислоты разведенной, 30 мл воды очищенной, 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 5 мл 6 М раствора уксусной кислоты и перемешивают (содержание ртути: 4; 6; 8; 10;

12 мкг соответственно). Далее определение проводят по методике, указанной выше. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах». Анализ СО проводят при каждом определении.

Примечания.

1. Испытуемый раствор – 0,2 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Основной стандартный раствор ртути металлической 1 мг/мл (раствор № 1). Помещают 0,5 г ртути металлической (точная навеска) в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 15 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Для определения содержания ртути отмеряют 10 мл стандартного раствора № 1, прибавляют 0,5 мл 10 % раствора квасцов железоаммонийных и медленно титруют 0,01 М раствором аммония роданида до оранжевого окрашивания раствора.

Содержание ртути (X_2) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{V \cdot 0,001003}{10}$$

где: V – раствор аммония роданида, мл;

0,001003 – количество ртути, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора аммония роданида, в г;

10 – объем испытуемого образца, в мл.

Раствор хранят в течение 3 мес при комнатной температуре в вытяжном шкафу в специально отведенном месте.

3. Стандартный раствор ртути металлической 10 мкг/мл (раствор № 2). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл стандартного раствора № 1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Возможно использование государственного стандартного образца (ГСО) раствора ионов ртути (II).

4. Стандартные образцы (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах» с различным диапазоном содержания тиомерсала в пределах от 20 до 120 мкг/мл.

5. Приготовление 5 % раствора калия перманганата. Растворяют 50 г калия перманганата в 700 мл горячей воды очищенной, помещенной в коническую колбу, охлаждают и переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

6. Приготовление 0,001 % раствора дитизона. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг дитизона (точная навеска), растворяют в хлороформе, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор хранят в темном месте при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Перед использованием 10 мл раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 597 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором (вода очищенная). Диапазон колебаний показаний оптической плотности от среднего значения не должен превышать $\pm 0,05$.

7. Приготовление 20 % раствора гидроксиламина сульфата. В мерном цилиндре вместимостью 500 мл в воде очищенной растворяют 100 г гидроксиламина сульфата, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной в течение 6 мес.

8. Приготовление 6 М раствора уксусной кислоты. Вносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл 340 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

9. Приготовление 50 % серной кислоты разведенной по объему. В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 100 мл воды очищенной и осторожно при постоянном перемешивании прибавляют 100 мл серной кислоты концентрированной. Работу следует проводить в вытяжном шкафу, соблюдая технику безопасности. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

10. Приготовление 0,1 М раствора аммония роданида (раствор А). Раствор готовят из 0,1 Н стандарт-титра (фиксанала) в мерной колбе вместимостью 1000 мл согласно инструкции по приготовлению. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 6 мес.

11. Приготовление 0,01 М раствора аммония роданида (раствор В). В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл раствора А и доводят объем водой очищенной до метки. Раствор готовят при каждом определении.

12. Приготовление раствора азотной кислоты разведенной. В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 100 мл воды очищенной и осторожно при постоянном перемешивании прибавляют 72 мл азотной кислоты концентрированной. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

13. Приготовление 10 % раствора квасцов железоммонийных. В 90 мл воды растворяют 10 г квасцов железоммонийных и прибавляют азотной кислоты разведенной до перехода коричневой окраски в желтовато-зеленую. В случае необходимости раствор фильтруют.

Полярографический метод

Испытуемый раствор помещают в колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой, прибавляют 0,5 мл 2 М раствора калия хлорида и помещают в электролизер, термостатируемый при температуре 19 – 21 °С. Через испытуемый раствор пропускают газообразный азот в течение 10-15 мин. Ртутный капельный электрод опускают в электролизер и снимают полярограмму на полярографе с регистрирующим устройством в области потенциала от 0,2 до 1,0 В (внутренний анод).

Содержание тиомерсала (X_3) в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X_3 = \frac{a \cdot 5,0}{4,5};$$

где: a – количество тиомерсала в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

5,0 – общий объем пробы, мл;

4,5 – объем испытуемого раствора, взятого на анализ, мл.

Построение калибровочного графика. К 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 мл стандартного раствора тиомерсала № 2 (150 мкг/мл тиомерсала) прибавляют 0,5 мл 2 М раствора калия хлорида, доводят общий объем водой очищенной до 5 мл (концентрация тиомерсала: 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 135 мкг/мл соответственно) и перемешивают. Определение проводят, как указано выше. На полученных полярограммах строят калибровочный график, откладывая среднее значение высоты волны на оси ординат (ОУ), а на оси

абсцисс (ОХ) – соответствующее значение концентрации тиомерсала в мкг/мл.

Калибровочный график пригоден неограниченное время для данного капилляра при постоянных условиях определения (температура, время каплеобразования).

Тиомерсал, используемый для приготовления стандартного раствора № 1, должен соответствовать требованиям, указанным в разделе «Методы оценки качества тиомерсала».

Приложения.

1. Испытуемый раствор – 4,5 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Стандартный раствор тиомерсала 15 мг/мл (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,50 г тиомерсала (точная навеска), растворяют в воде очищенной и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

3. Стандартный раствор тиомерсала 150 мкг/мл (раствор № 2). Перед определением 1 мл стандартного раствора тиомерсала №1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

4. Приготовление 2 М раствора калия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 149,1 г калия хлорида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии

Анализ проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора – электротермического атомно-абсорбционного спектрометра.

Испытуемый образец, приготовленный, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации, вносят в отверстие графитовой трубки прибора и измеряют оптическую плотность образцов при длине волны 253,7 нм в следующей последовательности: вода очищенная (контрольный раствор), калибровочные растворы (в порядке увеличения измеряемой концентрации), стандартный образец «Содержание тиомерсала в

сорбированных препаратах» и испытуемый образец. Анализ испытуемых образцов проводят не менее трех раз.

Содержание тиомерсала в испытуемом образце в мкг/мл рассчитывают по калибровочному графику с помощью программного обеспечения к прибору с учетом разведения испытуемого образца.

Построение калибровочного графика. Отбирают 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора тиомерсала № 2 (2 мкг/мл), доводят объем растворов водой очищенной до 1 мл и перемешивают (концентрация тиомерсала: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мкг/мл соответственно). Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество тиомерсала в мкг/мл, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности атомного пара ртути. Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии применим для ИЛП с содержанием тиомерсала от 20 до 120 мкг/мл, а также для анализа остаточного содержания тиомерсала.

Приложения.

1. Испытуемый раствор. Испытуемый раствор разводят водой очищенной, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Основной стандартный раствор тиомерсала 1 мг/мл (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 100 мг тиомерсала (точная навеска), растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

3. Стандартный раствор тиомерсала 2 мкг/мл (раствор № 2). К 20 мкл стандартного раствора № 1 прибавляют 9,98 мкл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 3 дней.

4. Стандартные образцы (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах» с диапазоном содержания тиомерсала от 20 до 120 мкг/мл. Перед использованием СО разводят согласно инструкции по применению. Раствор СО готовят и используют в день проведения анализа.

Методы оценки качества тиомерсала

О-этилртутьтиосалицилат натрия М.м. 404,8 $C_9H_9H_2NaO_2S$

Описание. Белый порошок с легким кремовым оттенком со слабым характерным запахом.

Растворимость. 1 г реактива без остатка растворяется при температуре 18 – 22 °С в 1 мл воды, а также в 35 мл спирта. Раствор должен быть бесцветным или светло-желтым. Препарат почти не растворим в бензоле и эфире.

Значение pH 6,0-8,0. Используют 1% раствор на свежeproкипяченной воде очищенной. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Подлинность. 0,05 г реактива растворяют в 5 мл воды очищенной. К раствору прибавляют 1,0 мл 10 % раствора меди сульфата. Образуется осадок зеленого цвета.

Растворяют 0,5 г реактива в 10 мл воды очищенной и прибавляют 1 мл 2 М раствора хлористоводородной кислоты, выделившийся осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера и промывают водой очищенной до исчезновения хлорид ионов. Осадок, высушенный до постоянной массы при комнатной температуре в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт.ст.), имеет температуру плавления 110 °С.

Ртутные соли. Растворяют 0,1 г реактива в 5 мл воды очищенной. К раствору прибавляют 1 мл 5 % свежеприготовленного раствора натрия сульфида. Выпавший осадок не должен изменять цвета при выдерживании в темном месте в течение 30 мин.

Растворимые в эфире вещества. 0,5 г реактива (точная навеска) встряхивают с 20 мл эфира в течение 10 мин, фильтруют через плотный фильтр. После испарения эфира остаток, высушенный в течение 22-24 ч в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт.ст.) и комнатной температуре, должен весить не более 4 мг.

Потеря в массе при высушивании. Высушивают 0,5 г реактива в течение 24 ч в присутствии фосфора (V) оксида до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,5 %. Определение проводят в соответствии ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Количественное определение. Растворяют 0,3 г реактива (точная навеска) в 10 мл воды очищенной в термостойкой колбе или химическом стакане вместимостью 50 мл, прибавляют 1,5 г растертого калия перманганата и хорошо перемешивают. Через 5 мин в колбу осторожно прибавляют при постоянном перемешивании по каплям 5 мл серной кислоты концентрированной. Через 5-10 мин образовавшийся осадок растворяют при постепенном прибавлении 4 - 8 мл 3 % раствора водорода пероксида. К обесцвеченному раствору прибавляют по каплям 5 % раствор калия перманганата до исчезающего розового окрашивания. Раствор вновь обесцвечивают добавлением по каплям 4 % раствора щавелевой кислоты. Полученный раствор после прибавления 5 мл 10 % раствора квасцов железоаммонийных медленно титруют 0,1 М раствором аммония роданида до изменения окраски. 1 мл 0,1 М раствора аммония роданида соответствует 0,02024 г тиомерсала.

Высушенный в присутствии фосфора (V) оксида реактив должен содержать не менее 98 % и не более 101 % тиомерсала.

Хранение. ЯД! Хранят в банке с притертой пробкой, в защищенном от света сейфе. Реактив подвергают контролю 1 раз в 3 мес. Если тиомерсал не соответствует одному из перечисленных требований, его бракуют.

Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах	ОФС.1.7.2.0026.15 Вводится впервые
---	---

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения белкового азота в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, образующимися после минерализации белковых продуктов.

Для количественного определения содержания белкового азота используются колориметрические методы:

- метод с предварительным осаждением белковых компонентов с использованием трихлоруксусной кислоты (ТХУ), рекомендуемый для определения белкового азота в вирусных вакцинах, анатоксинах и инфекционных аллергенах (методы А и В).
- метод с предварительным осаждением белковых компонентов с использованием фосфорновольфрамовой кислоты, рекомендуемый для определения белкового азота в неинфекционных аллергенах.

Метод с использованием трихлоруксусной кислоты для определения содержания белкового азота от 0,01 до 0,4 мг/мл (метод А)

В центрифужную пробирку вместимостью 10 мл вносят необходимое

количество испытуемого образца (А), прибавляют раствор ТХУ до конечной концентрации 10 % и перемешивают (табл.).

Таблица – Соотношение содержания белкового азота, объема анализируемого образца, реагента и минерализата для колориметрирования

Содержание белкового азота в анализируемом образце, мг/мл	Объем анализируемого образца (А), мл	Трихлоруксусная кислота		Объем минерализата (В), мл
		объем, мл	исходная концентрация, %	
0,010-0,016	5	0,72	80	2,0
0,016-0,030	3	0,43	80	2,0
0,030-0,050	3	0,43	80	1,0
0,050-0,080	2	2,00	20	1,0
0,080-0,200	1	1,00	20	1,0
0,200-0,400	1	1,00	20	0,5

Пробу оставляют на 18–20 ч при температуре 4–8 °С. Образовавшийся осадок отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием при 2000 об/мин при температуре 4–6 °С в течение 30 мин. Далее осадок промывают 1 мл 10 % раствора ТХУ и вновь центрифугируют в аналогичных условиях. К осадку прибавляют 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Пробирку закрывают стеклянным колпачком и минерализуют на песочной бане при температуре 190–210 °С. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Для ускорения минерализации используют водорода пероксид, который периодически добавляют по 1 – 2 капли в предварительно охлажденную пробирку. Минерализацию продолжают не менее 10 ч до обесцвечивания содержимого пробирки. К полученному минерализату добавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают.

В химическую пробирку вносят необходимое количество минерализата (В) (табл.), содержащего 8–20 мкг азота, доводят объем раствора до 9,5 мл водой очищенной, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание белкового азота». Анализ проводят при каждом определении.

Построение калибровочного графика. В химические пробирки вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл стандартного раствора № 2 (0,05 мг/мл аммония сульфата), доводят объем растворов водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают (содержание азота 5; 10; 15; 20; 25 мкг соответственно), прибавляют по 0,5 мл реактива Нesslerа и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность, как указано выше. В качестве контрольного раствора используют 9,5 мл воды очищенной и 0,5 мл реактива Нesslerа. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белкового азота (мкг), а по оси ординат - среднее значение оптической плотности.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Содержание белкового азота (X, мг/мл) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10}{A \cdot B \cdot 1000} = \frac{a}{A \cdot B \cdot 100},$$

где: а – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

А – объем анализируемого образца, мл;

В – объем минерализата, мл;

1000 – перевод мкг в мг;

10 – разведение минерализата.

Содержание белка по белковому азоту (Y, мг/мл) вычисляют по формуле:

$$Y = X \cdot 6,25,$$

где: X – содержание белкового азота, мг/мл;

6,25 – коэффициент пересчета белкового азота на белок.

Содержание белкового азота, полученное по методу А, должно составлять от 0,01 до 0,4 мг/мл.

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1, 2, 3 или 5 мл раствора испытуемого образца (согласно Таблице 1) (содержание белкового азота в анализируемой пробе должно быть 0,08 – 0,4 мг).

2. Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор №1). В мерной колбе вместимостью 500 мл в воде очищенной растворяют 0,2357 г аммония сульфата, доведенного до постоянной массы в эксикаторе над безводным кальция хлоридом, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Основной раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в колбе с притертой пробкой в течение 1 года.

3. Стандартный раствор аммония сульфата 0,05 мг/мл (раствор №2). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл раствора №1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4-8 °С в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

4. Стандартный образец (СО) «Содержание белкового азота».

5. Приготовление 80 % раствора ТХУ. Растворяют 150 г ТХУ в 100 мл воды очищенной. После этого 1 мл раствора титруют 1М раствором натрия гидроксида (индикатор - фенолфталеин).

Концентрацию ТХУ (X) в % в анализируемом растворе рассчитывают по формуле:

$$X = a \cdot 0,1634 \cdot 100 = a \cdot 16,34,$$

где: а – количество 1М раствора натрия гидроксида, израсходованное на титрование испытуемого образца, мл;

0,1634 – количество ТХУ, соответствующее 1 мл 1М раствора натрия гидроксида, г.

Концентрация ТХУ должна быть 80 – 90 %.

Раствор ТХУ разводят до концентрации 80 % и хранят в емкости из темного стекла в течение 6 мес. (растворы ТХУ меньших концентраций готовят соответствующим разведением 80 % раствора). Перед каждым использованием раствора ТХУ проводят проверочное определение ее процентной концентрации.

Метод с использованием кислоты трихлоруксусной для определения содержания белкового азота от 2,5 до 10 мкг/мл (метод В)

В центрифужную пробирку емкостью 10 мл вносят 5 мл испытуемого образца, прибавляют 0,72 мл 80 % раствора ТХУ и перемешивают. Далее проводят минерализацию испытуемого образца по методу А. Одновременно

в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Объем минерализата доводят до 5 мл водой очищенной и перемешивают. Отбирают в пробирку 1 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого и калибровочных растворов при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной слоя 20 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Содержание белкового азота (X) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5^a}{5^b \cdot 1 \cdot 1000} = \frac{a}{1000},$$

где: а – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

5^a – разведение минерализата, мл;

5^b – объем испытуемого образца, взятый на минерализацию, мл;

1 – объем минерализата, взятый на колориметрирование, мл;

1000 – перевод в миллиграммы.

Построение калибровочного графика. В химические пробирки вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора №3 (содержание белкового азота 2; 4; 6; 8; 10; 12 мкг соответственно), доводят объем раствора водой очищенной до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют по 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. В качестве контрольного раствора используют 9,5 мл воды очищенной и 0,5 мл реактива Несслера. Измеряют оптическую плотность растворов, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белкового азота (мкг), а по оси ординат - среднее значение оптической плотности.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Содержание белкового азота, полученное по методу В, должно составлять от 2,5 до 10 мкг/мл.

Примечания.

1. Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор №1). Приготовление указано в методе А.

2. Стандартный раствор аммония сульфата 0,02 мг/мл (раствор №3). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл раствора №1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4-8°C в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

3. Приготовление 80 % раствор ТХУ. Приготовление указано в методе А.

Метод определения белкового азота с использованием фосфорновольфрамовой кислоты

Определение проводят по ОФС «Определение белка» (метод В) с использованием фосфорновольфрамовой кислоты.

Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах должно быть от 0,01 до 0,4 мг/мл.

Построение калибровочного графика аналогично изложенному в методе А.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах». Анализ проводят при каждом определении.

Примечание.

Стандартный образец (СО) «Содержание белкового азота в неинфекционных аллергенах». Определение проводят в соответствии с инструкцией по применению.

**Определение общего азота
с реактивом Несслера
в иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0027.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения общего азота в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, образующимися после минерализации белковых продуктов. Для количественного определения содержания общего азота с реактивом Несслера используется колориметрический метод.

Колориметрический метод

В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл испытуемого образца (А), с содержанием общего азота от 0,05 до 0,4 мг (табл.), прибавляют 0,1 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. Пробирку закрывают стеклянным колпачком и минерализуют на песочной бане при температуре 190 – 210 °С. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл серной кислоты концентрированной. Минерализацию продолжают не менее 10 ч до обесцвечивания содержимого пробирки. Затем к минерализату прибавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают.

В химическую пробирку вносят 0,5 или 1,0 мл разведенного минерализата (В) (табл.), доводят объем раствора водой до 9,5 мл, перемешивают, прибавляют 0,5 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого и

калибровочных растворов при 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором, приготовленным аналогичным образом из контрольной пробы.

Построение калибровочного графика. В химические пробирки вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл стандартного раствора № 2 (содержание азота 5; 10; 15; 20; 25 мкг), доводят объем растворов водой до 9,5 мл, перемешивают и далее анализ проводят, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество мкг общего азота, а по оси ординат - среднее значение оптической плотности.

Калибровочный график воспроизводится при каждом анализе.

Таблица – Соотношение содержания общего азота в испытуемом образце и объема минерализата для колориметрирования

Содержание общего азота в испытуемом образце (А), мг/ 0,5 мл	Объем разведенного минерализата для колориметрирования (В), мл
0,050–0,200	1,0
0,200–0,400	0,5

Содержание общего азота (X) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10}{A \cdot B \cdot 1000} = \frac{a}{A \cdot B \cdot 100},$$

где: *a* – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

A – объем анализируемого образца, мл;

B – объем минерализата, мл;

1000 – перевод мкг в мг;

10 – разведение минерализата.

Содержание общего азота должно составлять от 0,1 до 0,8 мг/мл, если в фармакопейной статье или нормативной документации нет иных указаний.

Примечания.

1. Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор № 1). В воде очищенной в мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют

0,2357 г аммония сульфата, доведенного до постоянной массы в эксикаторе над безводным кальция хлоридом, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в колбе с притертой пробкой в течение 1 года.

2. Стандартный раствор аммония сульфата 0,05 мг/мл (раствор № 2). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл раствора № 1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Количественное определение
фенола спектрофотометрическим
методом в иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0028.15

Взамен ГФ Х

Настоящая фармакопейная статья предназначена для определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП). Метод основан на способности фенола поглощать свет в ультрафиолетовой области. Определение фенола проводится спектрофотометрическим методом. По результатам измерения оптической плотности растворов при 269 нм (максимум поглощения фенола) и 290 нм (максимум поглощения окрашенных примесей) определяется содержание фенола по калибровочному графику.

Спектрофотометрический метод

Готовят 10 мл разведенного испытуемого образца и измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов в кюветах с толщиной слоя 10 мм при 269 нм и 290 нм по сравнению с контрольным раствором (вода очищенная). Рассчитывают разность между показателем оптической плотности при 269 нм и 290 нм ($A_{269} - A_{290}$) и по калибровочному графику определяют количество фенола в разведенном образце в мкг/мл.

Количество фенола (X) в исходном образце в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 100}{1000} = \frac{a}{10},$$

где: а – количество фенола, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

100 – разведение испытуемого раствора;

1000 - пересчет в мг.

Содержание фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах должно составлять от 1,5 до 4,0 мг/мл.

Построение калибровочного графика. К 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл стандартного раствора В прибавляют воду очищенную до объема 5 мл и перемешивают (концентрация фенола соответственно: 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл), далее анализ проводят, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество мкг фенола, а по оси ординат - среднее значение разности между показателем оптической плотности при 269 нм и 290 нм ($A_{269} - A_{290}$).

Примечания.

1. Испытуемый раствор. К 0,1 мл испытуемого образца добавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают.

2. Основной стандартный раствор фенола 10 мг/мл (раствор А). Помещают 1,0000 г (точная навеска) фенола в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла при температуре 4 – 8 °С в течение 1 г.

3. Стандартный раствор фенола 100 мкг/мл (раствор В). Наливают 0,1 мл стандартного раствора А в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

Количественное определение	ОФС.1.7.2.0029.15
2-феноксиэтанола	
спектрофотометрическим методом	
в иммунобиологических	
лекарственных препаратах	Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод предназначенный для определения 2-феноксиэтанола в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП).

Определение проводится спектрофотометрическим методом. Метод основан на способности 2-феноксиэтанола поглощать свет в ультрафиолетовой области. По результатам измерения оптической плотности растворов при 269 нм (максимум поглощения 2-феноксиэтанола) и 290 нм (максимум поглощения окрашенных примесей) определяется содержание 2-феноксиэтанола по калибровочному графику.

Спектрофотометрический метод

Метод А (определение содержания 2-феноксиэтанола в мг/мл)

Испытуемый раствор сорбированного образца центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. К 0,1 мл надосадочной жидкости или к 0,1 мл несорбированного образца добавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов в кювете с толщиной слоя 10 мм при 269 и 290 нм по сравнению с контрольным раствором (вода очищенная). Находят разность между показателями оптической плотности при 269 и 290 нм ($A_{269} - A_{290}$) и

по калибровочному графику определяют количество 2-феноксиэтанола в разведенном образце, выраженное в мкг/мл.

Количество 2-феноксиэтанола (X_1) в исходном образце в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{a \cdot 100}{1000} = \frac{a}{10},$$

где:

a – количество 2-феноксиэтанола, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

100 – разведение испытуемого образца;

1000 – пересчет в мг.

Содержание 2-феноксиэтанола в ИЛП должно составлять от 4,25 до 5,75 мг/мл.

Построение калибровочного графика. К 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора № 2 прибавляют воду очищенную до 5 мл и перемешивают (концентрация 2-феноксиэтанола 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл соответственно), далее анализ проводят, как указано выше. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество 2-феноксиэтанола в мкг, а по оси ординат – среднее значение разности между показателем оптической плотности при 269 и 290 нм ($A_{269} - A_{290}$).

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого сорбированного образца или 0,1 мл испытуемого несорбированного образца.

2. Основной стандартный раствор 2-феноксиэтанола – 99,7 %, плотность – 1,1 г/мл.

3. Стандартный раствор 2-феноксиэтанола 5 мг/мл (раствор № 1). Помещают 0,227 мл основного стандартного раствора 2-феноксиэтанола в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Стандартный раствор 2-феноксиэтанола 100 мкг/мл (раствор № 2). Перед использованием 1 мл стандартного раствора № 1 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

Метод Б (определение содержания 2-феноксиэтанола в мкл/мл)

Проводят определение содержания 2-феноксиэтанола в мкл/мл по методу А. По калибровочному графику определяют количество 2-феноксиэтанола в разведенном образце в мкл/мл.

Количество 2-феноксиэтанола (X_2) в испытуемом образце в мкл/мл вычисляют по формуле:

$$X_2 = a \cdot 100,$$

где a – количество 2-феноксиэтанола, найденное по калибровочному графику, мкл/мл;

100 – разведение испытуемого образца.

Содержание 2-феноксиэтанола в ИЛП должно быть не более 10 мкл/мл.

Построение калибровочного графика. К 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора № 4 прибавляют воду очищенную до объема 5 мл и перемешивают (концентрация 2-феноксиэтанола 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 мкл/мл соответственно), далее анализ проводят, как указано в методе А. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество 2-феноксиэтанола в мкл/мл, а по оси ординат – среднее значение разности между показателем оптической плотности при 269 и 290 нм ($A_{269} - A_{290}$).

Примечания.

1. Испытуемый раствор. 1 мл раствора испытуемого сорбированного образца или 0,1 мл раствора испытуемого несорбированного образца.

2. Основной стандартный раствор 2-феноксиэтанола – 99,7 %, плотность – 1,1 г/мл.

3. Стандартный раствор 2-феноксиэтанола 5 мкл/мл (раствор № 3). Помещают 0,250 мл основного стандартного раствора 2-феноксиэтанола в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Стандартный раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Стандартный раствор 2-феноксиэтанола 0,1 мкл/мл (раствор № 4).
Перед использованием 1 мл стандартного раствора № 3 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Количественное определение хлоридов
методом осадительного
титрования в иммунобиологических
лекарственных препаратах**

ОФС.1.7.2.0030.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП) и их растворителях, не содержащих другие галогениды (иодиды, фториды, бромиды), окислители или соли ртути. Методы осадительного титрования основаны на реакциях осаждения определяемого компонента титрантом – раствором, образующим осадок с определяемыми компонентами.

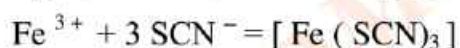
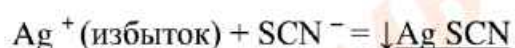
Для проведения реакции осаждения при титриметрическом анализе необходимо соблюдение следующих условий:

- 1) осадок должен быть практически нерастворим;
- 2) выпадение осадка должно происходить достаточно быстро;
- 3) результаты титрования не должны искажаться явлениями адсорбции (соосаждения);
- 4) при титровании должна фиксироваться точка эквивалентности.

Ионы хлора (Cl^-) определяют тиоцианометрическим (роданометрическим, аргентометрическим) методом по Фольгарду (обратное титрование). В качестве титранта используют стандартный раствор аммония тиоцианата (аммония роданида) NH_4SCN , в качестве индикатора для определения точки эквивалентности – насыщенный раствор квасцов железоаммонийных $(\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$.

Сущность метода обратного титрования по Фольгарду заключается в следующем: при добавлении к раствору, содержащему ионы хлора, избытка титрованного раствора серебра нитрата (AgNO_3) образуется осадок серебра хлорида (AgCl). Избыток серебра нитрата оттитровывают раствором аммония тиоцианата с образованием практически нерастворимого осадка серебра роданида (AgSCN) в присутствии индикатора – квасцов железоаммонийных. В точке эквивалентности ионы железа (III) взаимодействуют с тиоцианат-ионами (SCN^-), образуя растворимое комплексное соединение тёмно-красного цвета.

Процесс обратного титрования (по методу Фольгарда) протекает по следующей схеме реакций:



Определение хлоридов в лекарственных средствах

В коническую колбу вместимостью 50 -100 мл вносят точный объём образца (А), содержащий 0,3–1,5 мг хлор-ионов (что при пересчёте соответствует 0,5–2,5 мг натрия хлорида), прибавляют 8–10 мл воды очищенной, 5 мл (точный объём) 0,01 М раствора серебра нитрата, 1,0 мл азотной кислоты концентрированной и перемешивают. Содержимое колбы нагревают, доводят до кипения, и осторожно по каплям прибавляют насыщенный раствор калия перманганата, не допуская вспенивания и выплёскивания, до получения фиолетово-коричневого окрашивания, не исчезающего в течение 5 мин выдерживания колбы при температуре кипения. К горячему испытуемому раствору на конце шпателя прибавляют глюкозу (40–140 мг) до исчезновения окраски.

Пробы охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора квасцов железоаммонийных и при непрерывном перемешивании избыток 0,01 М раствора серебра нитрата медленно

титруют 0,01 М раствором аммония тиоцианата до появления отчетливой светлой коричневатой-оранжевой окраски.

Параллельно проводят контрольный опыт с пробой, не содержащей испытуемый образец (А).

Количество ионов Cl^- , вступивших в реакцию с AgNO_3 , определяют по разнице объёмов 0,01 М раствора NH_4SCN , пошедшего на титрование контрольного и анализируемого растворов.

Содержание хлоридов (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_{\text{к}} - V_{\text{оп}}) \cdot K \cdot 0,0003544}{A} \cdot 100,$$

где: $V_{\text{к}}$ – объем 0,01 М раствора аммония тиоцианата, пошедший на титрование контрольного раствора, мл;

$V_{\text{оп}}$ – объем 0,01 М раствора аммония тиоцианата, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл;

A – объем испытуемого раствора, взятого на анализ, мл;

K – поправочный коэффициент к молярности аммония тиоцианата;

0,0003544 – титр по хлор-иону* – количество хлоридов в г, соответствующее 1 мл 0,01М раствора аммония тиоцианата;

(*для пересчёта на натрия хлорид используют значение титра по натрия хлориду – 0,0005844, г/мл);

100 – коэффициент пересчёта в проценты.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора – указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Приготовление 0,1 М титрованного раствора серебра нитрата. В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют в воде очищенной 17 г серебра нитрата, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Около 0,15 г (точная навеска) натрия хлорида, прокалённого при температуре 250–300 °С до постоянной массы, растворяют в 50 мл воды очищенной, добавляют 1,0 мл 5 % раствора калия хромата (K_2CrO_4) и титруют приготовленным раствором серебра нитрата до появления слабой красновато-оранжевой окраски, не исчезающей при перемешивании.

Молярность (M) приготовленного раствора серебра нитрата проверяют по формуле:

$$M = a/0,05844 \cdot V,$$

где a – навеска натрия хлорида, г;

0,05844 – количество натрия хлорида, соответствующее 1 мл 1 М раствора натрия хлорида, г/мл;

V – объём раствора серебра нитрата, пошедший на титрование навески натрия хлорида, мл.

При несоответствии заданной молярности раствор укрепляют или разводят до 0,1 М, повторно проверяя титр раствора.

Раствор хранят в склянке из тёмного стекла с притёртой пробкой в защищённом от света месте при комнатной температуре.

3. Приготовление 0,01 М раствора серебра нитрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл 0,1 М титрованного раствора серебра нитрата, доводят объём раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор готовят перед использованием.

4. Приготовление 0,1 М титрованного раствора аммония тиоцианата. В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 7,6-8,0 г аммония тиоцианата, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Титр аммония тиоцианата устанавливают по 0,1 М раствору серебра нитрата. К 20 мл 0,1 М раствора серебра нитрата прибавляют 25 мл воды очищенной, 0,5 мл азотной кислоты концентрированной, 1 мл насыщенного раствора квасцов железоммонийных и титруют приготовленным раствором аммония тиоцианата до появления светлой жидкости коричнево-оранжевого цвета. Молярность раствора аммония тиоцианата вычисляют по формуле:

$$M = M_0 \cdot V_0/V,$$

где: M_0 – молярность 0,1 М раствора серебра нитрата, г;

V_0 – объём 0,1 М раствора серебра нитрата, мл;

V – объём 0,1 М раствора аммония тиоцианата, мл.

После определения титра раствор укрепляют или разводят до 0,1 М раствора, повторно проверяя титр.

Возможно приготовление 0,1 М раствора аммония тиоцианата из стандарт-титра в ампуле (фиксанала) согласно инструкции по применению.

5. Приготовление 0,01 М раствора аммония тиоцианата. В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл 0,1 М раствора аммония тиоцианата, доводят объём раствора водой очищенной до метки и тщательно перемешивают. Раствор готовят перед использованием.

6. Приготовление насыщенного раствора квасцов железоммонийных. В 100 мл воды очищенной растворяют 40 г квасцов железоммонийных, фильтруют, добавляют 16 % раствор азотной кислоты до перехода коричневой окраски в желтовато-зелёную. Раствор хранят во флаконе из тёмного стекла в защищённом от света месте при комнатной температуре.

7. Определение поправочного коэффициента к молярности аммония тиоцианата. Поправочный коэффициент определяют как отношение теоретически заданного объёма титранта (5 мл) к его объёму в контрольном эксперименте ($5/V_k$). Показатель поправочного коэффициента должен находиться в пределах $(1 \pm 0,02)$.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Испытание на присутствие
микоплазм**

**ОФС.1.7.2.0031.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья описывает испытание на присутствие микоплазм посевных (исходных) клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, посевного и рабочего вирусных банков, вирусных сборов, готового лекарственного препарата до розлива, готовой лекарственной формы препарата, которые согласно нормативной документации не должны содержать микоплазм. Кроме этого, испытанию на присутствие микоплазм подлежат клеточные культуры, используемые в лечебной практике, а также добавки к питательным средам (трипсин, сыворотка крови животных и пр.).

Условия проведения испытания

Испытание на присутствие микоплазм проводят при строгом соблюдении всех правил асептики в условиях, не оказывающих влияние на выявляемые микроорганизмы, исключающих контаминацию испытуемого образца, и обязательном мониторинге условий испытания.

Методы испытания

Испытание на присутствие микоплазм проводят следующими методами: микробиологическим (культуральным) – посев на питательные среды для выделения и культивирования микоплазм, и методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим) с использованием флуоресцирующего красителя ДНК.

Испытание посевных (исходных) клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур проводят 2 методами – микробиологическим и методом индикаторной клеточной культуры.

Испытание посевного и рабочего вирусного банков, вирусного сбора, готового препарата до розлива и готовой формы препарата на присутствие микоплазм проводят только микробиологическим методом.

Могут быть также использованы альтернативные методы испытания при условии проведения соответствующей валидации.

Микробиологический метод

Микробиологический метод испытания на присутствие микоплазм может быть выполнен по следующим схемам:

Схема 1 – посев испытуемого образца на полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3% агара (среда Каган полужидкая), и последующее инкубирование посевов во влажной атмосфере при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 14 сут.

Схема 2 – посев испытуемого образца в жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая), инкубирование в течение 7 сут во влажной атмосфере при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ с последующим пересевом на полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара, и инкубированием в течение 14 сут во влажной атмосфере при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Учет результатов при проведении испытаний по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3, 7, 10 и 14 сут. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы стерильных (незасеянных) питательных сред.

Питательные среды

Для проведения испытания на присутствие микоплазм используют полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3 % агара (среда Каган полужидкая).

Для подтверждения наличия микоплазм используют плотную питательную среду, содержащую 1,3 % агара (среда Каган плотная), на которой микоплазмы формируют характерные колонии в форме яичницы-глазуньи.

Жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая) используют как вспомогательную для накопления микоплазм.

Все среды Каган для выделения и культивирования микоплазм готовят на одной основе – *среде Каган жидкой*, в состав которой входят:

- Гидролизат бычьего сердца жидкий – 200 мл (сухой – 20 г);
- Мясная вода – 400 мл или
- Мясной экстракт – 13 г (3,0–3,5 % сухих веществ на 1 л среды);
- Дрожжевой экстракт (экстракт хлебопекарных дрожжей) – 5,0 г (1,5 г сухих веществ на 1 л среды);
- Натрия хлорид – 5,0 г;
- Вода очищенная – до 1 л.

Значение рН готовой среды после стерилизации ($7,8 \pm 0,1$).

Для приготовления полужидкой среды, содержащей 0,3% агара, дополнительно вносят 3,0 г агара микробиологического на 1 л среды. Для приготовления плотной среды, содержащей 1,3 % агара, дополнительно вносят 13 г/л агара микробиологического.

Приготовление питательных сред. В воду очищенную по прописи добавляют гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарных дрожжей, натрия хлорид и перемешивают. Для приготовления полужидкой или плотной среды дополнительно вносят 3,0 г или 13,0 г агара соответственно. Доводят рН среды до ($8,1 \pm 0,1$) 10 % раствором натрия гидроксида. Среду нагревают до кипения, кипятят 2–3 мин и фильтруют. С помощью 5 % раствора хлористоводородной кислоты устанавливают рН ($7,8 \pm 0,1$).

Среды разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 110°C в течение 30 мин. Готовые среды хранят при температуре от 2 до 8 °C не более 4 мес.

Стерильность питательных сред. После стерилизации не менее 5 % емкостей от каждой партии питательной среды инкубируют параллельно с посевом испытуемого образца. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

Подготовка сред для проведения испытания. Перед применением полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара, нагревают на водяной бане до полного расплавления агара и охлаждают до температуры 40–45 °С. Добавляют 15–20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

При необходимости возможно внесение во все готовые питательные среды стерильного раствора аргинина до конечной концентрации 1 % и стерильного раствора глюкозы до конечной концентрации 1 %. В качестве индикатора роста микоплазм допускается внесение в жидкую среду Каган раствора фенолового красного 5,0 мл (0,6 г/л).

Готовую полужидкую среду разливают по 10 мл в пробирки и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

При проведении испытания на присутствие микоплазм допустимо использование альтернативных питательных сред при условии подтверждения их соответствия требованиям по ростовым свойствам в отношении соответствующих штаммов.

Определение ростовых свойств среды

Каждую партию приготовленной полужидкой питательной среды, предназначенной для проведения испытания на присутствие микоплазм, проверяют на ростовые свойства, используя «Стандартный образец тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230», в соответствии с инструкцией по применению. Для проверки ростовых свойств, в зависимости от типа испытуемого препарата, также можно использовать другие виды микоплазм, полученные из музейных коллекций: *M. orale*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinae*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*.

При проведении испытания по определению ростовых свойств среды тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ вносят в 3–4 пробирки с испытуемой полужидкой питательной средой. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре (37±1)°С. Если в течение

времени инкубации в инокулированной среде визуально отмечают рост микоплазм, среду считают пригодной для использования.

Определение ингибирующего действия испытуемого образца

Для правильной оценки проводимого испытания на присутствие микоплазм однократно определяют наличие ингибирующего действия для каждого наименования испытуемого образца. Определение ингибирующего действия может быть проведено одновременно с определением ростовых свойств питательной среды.

При проведении испытания по схеме 1 в 3–4 пробирки с 10 мл полужидкой питательной среды, содержащей 0,3 % агара, вносят 0,5 мл испытуемого образца и 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

При проведении испытания по схеме 2 в 100 мл жидкой питательной среды вносят 10 мл испытуемого образца и 10 – 100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230, инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут и далее высевают по 0,5–1 мл на полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара. Инкубируют во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

В качестве положительного контроля, в зависимости от применяемой схемы, используют аналогичное объему испытуемого образца количество стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230.

В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют стерильные образцы питательных сред.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете. Если в контроле наблюдают рост тест-штамма, а в опыте рост отсутствует, считают, что испытуемый препарат обладает ингибирующим действием, которое следует устранить разведением или другим способом.

Схема 1. Испытание на присутствие микоплазм методом прямого посева

Испытуемый образец вносят по 0,5 мл в каждую из 10 пробирок с полужидкой питательной средой, содержащей 0,3 % агара (среда Каган полужидкая). Посев производят прокалыванием всего столбика питательной среды концом пипетки, выпуская равномерно ее содержимое при продвижении пипетки в толще среды от дна к ее поверхности. Посевы инкубируют во влажной атмосфере в течение 14 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

При проведении испытания на присутствие микоплазм в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ или один из тест-штаммов, использованных при оценке ростовых свойств.

Схема 2. Испытание на присутствие микоплазм методом посева с предварительным накоплением

Испытанию подлежат препараты, вызывающие помутнение питательной среды или обладающие ингибирующим действием. Методика посева включает предварительный высев испытуемого образца в жидкую питательную среду (среда Каган жидкая) для накопления и инкубирования в течение 7 сут с последующим пересевом на полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара, и инкубированием в течение 14 сут.

Микробиологический метод испытания позволяет обнаруживать одну и более колоний микоплазм в объеме не более 100 мл.

Обнаружение микоплазм микробиологическим методом с предварительным накоплением состоит из следующих этапов:

1. Внесение 10 мл испытуемого образца в 100 мл жидкой питательной среды, инкубирование во влажной атмосфере в течение 7 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
2. Пересев на 7 сут от начала исследования по 0,5–1,0 мл бульонной культуры в каждую из 10 пробирок с полужидкой средой,

содержащей 0,3 % агара. Инкубирование во влажной атмосфере в течение 14 сут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

При проведении испытания в качестве положительного контроля может быть использован тест-штамм *M. arginini* G230 в количестве 10–100 КОЕ или один из тест-штаммов, использованных при оценке ростовых свойств среды. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы стерильных питательных сред.

Учет и интерпретация результатов

Учет результатов испытания по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 3, 7, 10 и 14 сут, сравнивая результат с контрольными пробирками. На 14 сут проводят окончательный учет результатов. Наличие роста микоплазм оценивают визуально по обнаружению легкой мутности или зернистости в зоне посева. При отсутствии видимого роста микоплазм испытуемый образец считают прошедшим испытание. В случае роста микоплазм испытуемый образец считают не удовлетворяющим требованиям испытания.

Испытание считается недействительным, если обнаружен нетипичный, вызывающий сомнения, рост микоплазм, обнаружен рост посторонних микроорганизмов в отрицательном контроле или ростовые свойства питательной среды неудовлетворительны, а также при отсутствии роста микоплазм в положительном контроле или, напротив, при обнаруженном росте в отрицательном контроле. В случае признания испытания недействительным проводят повторные испытания.

Метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод)

Метод обнаружения микоплазм с использованием индикаторной клеточной культуры *Vero* (или другой клеточной культуры, чувствительной к микоплазмам) основан на внесении испытуемого образца в клеточную

культуру и последующей обработке клеток культуры тканей специфическим флюоресцирующим красителем Hoechst-33258 (Bisbenzimidide).

Методика испытания

Испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры проводят в асептических условиях, выполняя следующие операции.

1. В стерильную чашку Петри помещают стерильное предметное стекло и вносят 20–23 мл суспензии клеточной культуры *Vero* в питательной среде Игла MEM или ДМЕМ в концентрации не более 10^5 кл/мл и добавляют не более 5 % сыворотки эмбриональной, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

2. Вносят 1 мл испытуемого образца в чашку Петри и инкубируют в течение 3–5 сут при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ до формирования 50–70 % монослоя. Образование монослоя наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок. $10\times$, об. $20\times$.

3. Культуральную жидкость сливают, промывают препарат фосфатным буферным раствором (рН 7,2–7,4).

4. Помещают предметное стекло на 30–35 мин в 96° этиловый спирт.

5. Спирт сливают и сушат препарат на воздухе.

6. Окрашивают рабочим раствором красителя Hoechst-33258 в защищенном от света месте при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30–35 мин.

7. Краситель сливают, препарат промывают стерильной водой очищенной, подсушивают на воздухе и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

Примечания.

1. Приготовление красителя Hoechst-33258 (Bisbenzimidide)

А. Приготовление концентрированного раствора. В 100 мл стерильной воды очищенной растворяют 5 мг красителя. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ не более 1 года.

Б. Приготовление основного раствора. К 100 мл стерильной воды очищенной добавляют 0,5 мл концентрированного раствора красителя и перемешивают. Раствор готовят перед использованием.

В. Приготовление рабочего раствора. Основной раствор красителя смешивают с раствором Хенкса без индикатора в соотношении 1:9 и используют для окраски испытуемых образцов немедленно.

2. Подготовка люминесцентного микроскопа. Устанавливают и используют для анализа препаратов фильтры: ФС1-4, СС15-2, БС8-2. Просматривают препараты в люминесцентном микроскопе при увеличении ок.10×, об.90× (масляная иммерсия) или об.70×/85× (водная иммерсия).

3. Подготовка предметных стекол. Предметные стекла промывают в проточной водопроводной воде в течение 10–15 мин, затем кипятят 5–7 мин в воде очищенной, протирают стерильной салфеткой и помещают на 1 сут в смесь Никифорова (смесь равных объемов 96° этилового спирта и эфира для наркоза). Стекла извлекают из смеси Никифорова с помощью пинцета, протирают стерильной салфеткой и стерилизуют в течение (30 ± 2) мин при температуре (120 ± 2) °С.

Учет и интерпретация результатов

Учет результатов испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим методом) проводят, просматривая препараты в люминесцентном микроскопе. Микоплазмы преимущественно выявляются по границам клеток и в межклеточном пространстве как однородно окрашенные тела сферической формы расположенные попарно или цепочками клеток с ярким зеленоватым свечением.

Положительными контрольными образцами служат контаминированные микоплазмами культуры клеток, а отрицательными – клеточные культуры, в которых микоплазмы не выявлены.

При отсутствии характерного для микоплазм свечения испытуемый образец считают удовлетворяющим требованиям испытания.

Обнаружение микоплазм свидетельствует о контаминации испытуемого образца микоплазмами, и образец считается не соответствующим требованиям испытания.

**Определение содержания
анатоксинов в реакции
антитоксинсвязывания**

ОФС.1.7.2.0032.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания, которая основана на способности анатоксинов образовывать комплекс антиген – антитело со специфическими антитоксинами. При внесении в раствор анатоксина определенного количества соответствующего антитоксина часть последнего связывается с анатоксином в эквивалентном соотношении. Содержание не связавшегося антитоксина определяют по его токсиннейтрализующей способности. На основании полученных результатов определяют содержание анатоксина в испытуемом растворе.

Для проведения испытания используют стандартные образцы антитоксинов, калиброванные в Международных единицах (МЕ). Количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ соответствующего антитоксина, принимают за 1 единицу связывания (ЕС). Специфическую активность анатоксинов, определяемую в реакции антитоксинсвязывания, выражают в ЕС/мл.

ИСПЫТАНИЯ

Перед проведением испытания устанавливают опытную дозу токсинов, используемых при определении содержания антитоксинов в испытуемой среде.

Столбнячный анатоксин

За опытную дозу принимают минимальное количество столбнячного

токсина, которое при введении мышам в смеси с 0,01 МЕ столбнячного антитоксина вызывает гибель 50 % животных в течение 4 сут.

При определении опытной дозы готовят не менее 7 последовательных разведений токсина в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся одно от другого на 10 – 20 %. В ряд пробирок вносят по 1 мл столбнячного антитоксина, содержащего 0,1 МЕ, 1 мл одного из разведений токсина и 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смеси инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 2) мин и вводят 4 белым мышам массой тела 16 -18 г подкожно в объеме 0,4 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут, регистрируя количество павших от каждого разведения токсина. В результате испытания отмечают наибольшее разведение токсина, вызвавшее гибель 50 % животных в группе. Готовят разведение токсина, содержащее 10 опытных доз в 1 мл.

Для использования в опыте антитоксинсвязывания готовят разведение токсина.

Проведение реакции антитоксинсвязывания

Исходя из предполагаемого содержания анатоксина в растворе, готовят несколько его последовательных разведений до 0,1 ЕС/мл, отличающихся друг от друга на 10–25 % (табл.). Подготовленные разведения вносят по 1 мл во флаконы и добавляют по 0,2 МЕ столбнячного антитоксина в объеме 2 мл. Смеси тщательно перемешивают и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 2) мин для связывания анатоксина с антитоксином. После окончания инкубации определяют содержание оставшегося свободным антитоксина. С этой целью в каждый флакон вносят 1 мл токсина, содержащего 10 опытных доз. Смеси инкубируют при тех же условиях и вводят группам мышей (не менее 4 животных в каждой) подкожно по 0,4 мл.

Испытания проводят совместно с контролем опытной дозы токсина. Смесь, состоящую из 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, 1 мл раствора столбнячного антитоксина (0,1 МЕ/мл) и 1 мл раствора токсина,

содержащего 10 опытных доз, инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 2) мин и вводят мышам подкожно по 0,4 мл.

За животными опытной и контрольной групп наблюдают в течение 4 сут, регистрируя появление симптомов заболевания у животных в каждой группе. Мышей с признаками столбняка усыпляют. Результат выражают как отношение количества выживших животных к общему количеству животных в каждой группе. Отмечают разведение анатоксина с наименьшей предполагаемой активностью, которое при введении мышам опытной группы вызвало такой же эффект, как у мышей контрольной группы. Это означает, что из 0,2 МЕ столбнячного антитоксина, находившихся в смеси, 0,1 МЕ антитоксина не связалась с анатоксином и вступила в реакцию нейтрализации токсина. Следовательно, 0,1 МЕ антитоксина связала анатоксин и его активность равна 0,1 ЕС/мл. Для определения содержания анатоксина в исходном растворе учитывают его разведение (табл.).

Таблица – Схема приготовления разведений испытуемого анатоксина

Показатель	№ флакона (разведения)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Предполагаемая активность анатоксина ЕС/мл	200	250	300	350	400	450	500	550	600
Количество анатоксина в разведении 1:100 мл	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Количество 0,9 % раствора натрия хлорида мл	19	24	29	34	39	44	49	54	59

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е

Перед проведением испытания устанавливают опытную дозу ботулинических токсинов типов А, В и Е, используемых в реакции

антитоксинсвязывания.

За опытную дозу ($L^+/50$) ботулинических токсинов типов А, В и Е принимают минимальное количество токсина, которое при внутривенном введении мышам в смеси с $1/50$ МЕ соответствующего антитоксина вызывает гибель 50 % животных в течение 4 сут.

Для определения опытной дозы готовят 5 – 7 последовательных разведений токсина в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся одно от другого на 10 – 20 %. Для этого в ряд пробирок вносят по 1,5 мл одного из разведений токсина, 1 мл соответствующего антитоксина, содержащего 0,1 МЕ, и 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смеси инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин и вводят группам белых мышей с массой тела 16 – 18 г (не менее 4 животных в каждой группе) внутривенно в объеме 0,7 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут, учитывая количество павших животных от каждого разведения токсина. Наибольшее разведение токсина, вызвавшее гибель 50 % животных в группе, считают рабочим разведением (1,5 мл этого разведения содержат 5 опытных доз).

Проведение реакции антитоксинсвязывания

Исходя из предполагаемого содержания анатоксина в испытуемом препарате, готовят несколько его последовательных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся друг от друга на 10 – 25 % до 0,1 ЕС/мл (табл.). По 1 мл одного из разведений анатоксина помещают во флаконы и добавляют по 1 мл соответствующего антитоксина, содержащего 0,2 МЕ. Смеси тщательно перемешивают и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин. Во время инкубации происходит связывание испытуемого анатоксина с антитоксином в эквивалентном соотношении. Содержание антитоксина, не связавшегося с анатоксином, определяют по его токсиннейтрализующей способности. С этой целью в каждый флакон вносят 1,5 мл соответствующего токсина, содержащего 5

опытных доз. Смеси инкубируют при тех же условиях и вводят внутривенно по 0,7 мл группам мышей (не менее 4 животных в каждой).

Испытания проводят совместно с контролем опытной дозы токсина. С этой целью готовят смесь, состоящую из 1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, 1 мл раствора антитоксина (0,1 МЕ/мл) и 1,5 мл раствора токсина, содержащего 5 опытных доз. Смеси тщательно перемешивают, инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин и вводят внутривенно по 0,7 мл мышам опытных и контрольной групп.

За животными наблюдают в течение 4 сут, учитывая количество больных и павших в каждой группе. Отмечают разведение анатоксина с наименьшей предполагаемой активностью, вызвавшее у мышей опытной группы такой же эффект, как в контрольной группе. Это означает, что из 0,2 МЕ антитоксина, находившихся в смеси, 0,1 МЕ антитоксина не связалась с анатоксином и вступила в реакцию нейтрализации токсина. Следовательно, 0,1 МЕ антитоксина связала анатоксин, активность которого равна 0,1 ЕС/мл. При определении содержания анатоксина в исходном растворе учитывают его разведение.

**Метод иммуноферментного
анализа**

**ОФС.1.7.2.0033.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод иммуноферментного анализа (ИФА). Метод ИФА является высокочувствительным и высокоспецифичным иммунодиагностическим методом, с помощью которого проводят качественное и количественное определение различных веществ, обладающих свойствами антигена, гаптена (неполноценного антигена) или антитела. Метод ИФА широко используется для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний человека и животных и может также применяться для подтверждения качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Принцип метода заключается в реакции специфического взаимодействия антигена с антителом с образованием иммунного комплекса и последующей детекции полученного комплекса с помощью спектрофотометрии, хемилюминесценции и других адекватных методик. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью, либо оно помечено ферментной меткой), так и косвенной или непрямой (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с антителами, мечеными ферментом). Качественный анализ позволяет получить информацию о содержании антигена или антитела в исследуемом материале по принципу «есть/нет». При проведении количественного анализа определяют концентрацию антигена или антитела в исследуемом материале с использованием калибровочного графика.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Метод ИФА включает 3 основных этапа: 1) образование иммунного комплекса «антиген (исследуемое вещество) – специфическое к нему антитело» или наоборот; 2) формирование связи конъюгата с образовавшимся на предыдущем этапе иммунным комплексом или со свободными местами связывания (детерминантами); 3) преобразование субстрата под действием ферментной метки в регистрируемый сигнал в результате биохимической реакции.

Все методики выполнения иммуноферментного анализа классифицируются как гомогенные или гетерогенные.

Методики, в которых все 3 стадии ИФА проходят в растворе, и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, относятся к группе гомогенных методов ИФА. В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит процесс ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. В результате реакции антиген–антитело активность фермента восстанавливается. При образовании иммунного комплекса антиген–антитело, содержащего ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95 % по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена происходит связывание все больше антител, и сохраняется все больше свободных конъюгатов «антиген–фермент», способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Гомогенный метод ИФА проводится очень быстро. На анализ одного определения требуется 1 мин. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя и обязательна

стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно-гетерогенным, если 1 стадия – образование специфических комплексов – происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

Метод гетерогенного ИФА состоит из 3 основных этапов:

- 1) иммобилизация антигена или антитела на твердой фазе, полученный комплекс называется иммуносорбентом;
- 2) удаление несвязавшегося реагента и блокирование сайтов связывания на твердой подложке с помощью блокирующих белков, таких, например, как альбумин, казеин; инкубация анализируемого препарата с иммуносорбентом для того, чтобы произошло их связывание;
- 3) детекция благодаря ферментативной активности самого исследуемого вещества или благодаря связанной с анализируемым препаратом ферментативной метке (прямой вариант). В некоторых случаях производится дополнительная инкубация комплекса «иммуносорбент–исследуемое вещество» с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой (непрямой вариант).

Количественное определение исследуемого вещества осуществляется путем добавления подходящего для используемого детектора субстрата и сравнения сигнала исследуемого вещества со стандартным образцом.

Метод гетерогенного ИФА подразделяют на неконкурентный ИФА и конкурентный ИФА. Схемы анализа могут быть модифицированы в процессе разработки лекарственного препарата в соответствии с необходимыми требованиями. Изменения должны быть указаны в фармакопейной статье или

нормативной документации. Выбор способа постановки ИФА зависит от природы исследуемого вещества и его количества, так как разные виды ИФА обладают различной чувствительностью. Для оценки качества веществ, содержащих антитела, возможно использование специфичных антиидиотипических антител.

Неконкурентный метод ИФА

Неконкурентный метод ИФА подразделяется на несколько видов по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

Прямой вариант ИФА

Может выполняться 2 способами. В первом случае исследуемое вещество (антиген) непосредственно иммобилизовано на твердой фазе; тогда связавшееся с антигеном меченое антитело является детектором. При выполнении теста иным способом используют иммобилизованные на твердой фазе антитела. В этом случае детектором является исследуемое вещество, меченное ферментом.

Косвенный (непрямой) вариант ИФА

При выполнении непрямого варианта ИФА антиген иммобилизован на твердой фазе. После блокировки к антигену прибавляют раствор специфических к нему антител. После инкубации образовавшийся комплекс антиген-антитело отмывают от несвязавшихся антител и добавляют меченный ферментом анти-иммуноглобулин (анти-Ig), выступающий в роли детектора. Анти-Ig детекторы коммерчески доступны для конкретных классов и подклассов Ig, что делает этот формат анализа удобным для изотипирования антител. Кроме того, использование меченого анти-Ig усиливает сигнал по сравнению с прямым методом иммуноферментного анализа, тем самым увеличивая чувствительность анализа.

Метод «сэндвича» как вариант постановки ИФА

Наиболее распространенным неконкурентным методом является «сэндвич» метод. При его выполнении на твердой фазе иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Затем к ним прибавляют исследуемое вещество, содержащее антиген, и инкубируют. После инкубации комплекс антиген–антитело отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют вторичные антитела, меченные ферментом, и проводят детекцию.

Конкурентный метод ИФА

Конкурентный метод ИФА подразделяется на несколько видов: по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

Прямой конкурентный вариант ИФА

Для обнаружения или количественного определения растворимых антигенов применяют прямой конкурентный вариант ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном. Для этого используют антиген-специфические антитела, конъюгированные с соответствующим детектором (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, рутений или флуоресцеин). На твердую фазу иммобилизуют стандартный антиген с последующей блокировкой. Конъюгированное с ферментативной меткой антитело инкубируют с исследуемым веществом (растворимым антигеном). Затем эту смесь добавляют к иммобилизованному антигену, инкубируют, а потом отмывают от несвязавшегося комплекса антиген–антитело. Следующий шаг заключается в добавлении подходящего субстрата для используемого в качестве метки фермента. Ингибирование реакции, обусловленное наличием 2 антигенов в системе, по сравнению с контрольным образцом без конкурентного растворимого антигена, является обратно пропорциональным значению количества исследуемого вещества.

Выполнение прямого конкурентного варианта ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антителом аналогично прямому конкурентному ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном,

однако используется для обнаружения или количественного определения антител.

Косвенный (непрямой) конкурентный вариант ИФА

Этот способ постановки ИФА аналогичен прямому конкурентному варианту, однако вместо меченого антитела или антигена при детекции используется меченый анти-Ig реагент или меченые вторичные антитела, соответственно.

Общие условия проведения метода ИФА

В качестве твердой фазы для проведения иммуноферментного анализа применяют различные материалы: силикон, нитроцеллюлоза, полиамиды, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, акрил и другие. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и другие планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки. От выбора твердой фазы зависит принцип иммобилизации (гидрофобное, гидрофильное, ковалентное взаимодействие). Чаще других в качестве твердой фазы используют 96-луночные пластиковые планшеты для микротитрования. Количество лунок в планшете может варьироваться. Планшет может быть прозрачным (колориметрическая детекция) и матовым (хемилюминесцентная детекция, флуориметрия).

Иммобилизацию необходимо проводить без пузырьков воздуха в лунке, так как их присутствие изменяет показание оптической плотности. Возможно использование биотинилированных иммобилизованных реагентов. В этом случае в реакции используют стрептавидин и биотинилированную ферментативную метку. Данный метод используется для усиления сигнала. Время и температура иммобилизации, зависящие от кинетической природы, стабильности и концентрации реагента, должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Все стадии иммуноферментного анализа, промывочные и блокирующие растворы, временные промежутки и температурные условия для каждой стадии, количество оборотов в минуту для инкубации на шейкере, условия

детекции также должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Примеры методик для некоторых видов ИФА

Косвенный неконкурентный метод ИФА

I. Сорбция антигена. В каждую лунку 96-луночного планшета вносят 0,1-0,5 мкг антигена и 100 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (рН 9,6), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и далее проводят сорбцию при температуре 4 °С в течение 16 ч. Возможно использование других буферных растворов с высокими значениями рН. Инкубация проводится при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка (двукратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0), содержащим 0,1 % твин-20 (по 300 мкл на лунку), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

II. Блокировка. Для блокирования мест неспецифического связывания антигенов или антител лунки планшета заполняют фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0) или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации, содержащим 1% раствор бычьего сывороточного альбумина или других белков (казеина, желатина, сухого молока и др.), и инкубируют в течение 10–15 мин при комнатной температуре (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

III. Титрование специфических антител. При необходимости количественной оценки исследуемое вещество (антиген или антитело) титруют в серийных разведениях параллельно со стандартным образцом (СО).

Титрование можно проводить как в горизонтальных, так и в вертикальных рядах планшета. Необходимо отметить, что титрование антител проводится в том случае, если необходимо подобрать оптимальную концентрацию антител или определить их титр. В том случае, если

оптимальная концентрация и/или титр антител определены, то используют рекомендованное для данных антител (сыворотки) разведение.

При титровании в первую лунку ряда вносят готовое разведение антител – в среднем 1–10 мкг на лунку, далее производят последовательное разведение антител в лунках. Инкубацию со специфическими антителами проводят в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора pH 9,0, содержащего 0,1% твин-20.

IV. Добавление антивидовых (антиглобулиновых) антител, конъюгированных с ферментной меткой. В качестве детекторных (вторичных) антител используются антивидовые поликлональные антитела, конъюгированные с ферментативной меткой. Чаще всего используются козы или кроличьи антитела, специфичные к целой молекуле или к Fc-фрагментам специфических антител. Концентрация детекторных антител, как правило, указывается производителем в виде разведения исходного раствора (например, 1:1000).

Инкубация с вторичными мечеными антителами проводится в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (pH 9,0), содержащего 0,1 % твин-20.

Инкубация проводится в течение 10 мин при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

V. Проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта. В лунки вносят по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп реагент», который добавляют во все исследуемые и

контрольные пробы в равных количествах. Наиболее часто в качестве «стоп реагента» применяют серную кислоту.

Прямой неконкурентный метод ИФА

Методика прямого ИФА имеет лишь небольшие отличия от методики непрямого неконкурентного ИФА. Так, I и II стадии одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте ИФА на стадии III используют специфические исследуемому антигену антитела, конъюгированные с ферментной меткой, и они прямо взаимодействуют с исследуемым веществом. При необходимости также можно проводить титрование конъюгатов аналогично принципу, описанному ранее для неконъюгированных антител. Стадия IV в рамках прямого неконкурентного ИФА не проводится.

«Сэндвич» метод ИФА

В данном варианте ИФА используется пара антител (первичные и вторичные), специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена.

I. Сорбция антител на твердой фазе. Методика сорбции антигена аналогична методике сорбции антител в разделе «Косвенный неконкурентный метод ИФА».

II. Блокировка. Методика блокировки мест неспецифического связывания на подложке (твердой фазе) аналогична методике блокировки, описанной в разделе «Косвенный неконкурентный метод ИФА».

III. Инкубация с антигеном. В лунки планшета с преадсорбированными антителами вносят по 50 мкл исследуемого вещества и стандартных разведений антигена, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Разведения антигена должны быть приготовлены на основе фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1 % твин-20, поскольку твин-20 снижает неспецифическое связывание белковых молекул друг с другом и с поверхностью планшета. И

исследуемое вещество, и стандартные разведения антигена вносят попарно в соседние в горизонтальном ряду лунки (либо по 3 повторности), используя по 2 (3) лунки на каждое разведение белка.

Инкубацию проводят при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0), содержащим 0,1 % твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

IV. Инкубация с антителами, конъюгированными с ферментной меткой. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора специфических антител, конъюгированных с ферментной меткой. Оптимальная концентрация конъюгированных антител, как правило, указывается в фармакопейной статье или нормативной документации (обычно используют концентрацию 2–4 мкг/мл).

Инкубация с антителами, содержащими ферментную метку, проводится в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1 % твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

V. Проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта. Методика проведения ферментативной реакции аналогична методике, описанной в разделе: «Косвенный неконкурентный метод ИФА».

Детекция

Как было указано выше, для детекции используются меченные ферментной меткой или другим реагентом антитела. В качестве ферментной метки могут выступать, например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза или галактозидаза. В качестве детектора могут быть использованы антитела

или антигены с другими метками. Выбор реагента-детектора зависит от типа метки, конъюгированной с антителом или антигеном и способа детекции.

В качестве методов детекции могут быть использованы спектрофотометрия, хемилюминесценция, флуориметрия и другие методы, исходя из выбора метки.

Результаты количественного метода ИФА

Результаты количественного метода ИФА рассчитывают по линейной калибровочной кривой с обратной регрессией или с помощью комплексного метода, использующего нелинейную калибровочную кривую с обратной регрессией. Методика интерпретации результатов зависит от используемого способа постановки ИФА. Например, по результатам испытания с помощью калибровочной кривой можно оценивать концентрацию неизвестного образца, проводить оценку полумаксимальной концентрации ингибирования или эффективной концентрации. Это позволяет определять количество исследуемого вещества или его активность в сравнении с эталонным/калибровочным стандартным образцом (СО). Обычно вид калибровочной кривой при выполнении количественного метода ИФА, характеризующий концентрацию анализируемого препарата, зависит от рассчитанного среднего значения нелинейно. В связи с этим, рекомендуется использовать различные математические модели для анализа полученной кривой. В остальных случаях метод ИФА используют как качественный метод, позволяющий оценить наличие того или иного исследуемого вещества в пробе в пределах чувствительности методики.

Примечание.

Приготовление карбонат-бикарбонатного буферного раствора (рН 9,6).

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл вносят 1,59 г натрия карбоната (безводного) или 4,29 г натрия карбоната 10-водного и 2,93 г натрия гидрокарбоната, растворяют в 800 мл воды очищенной, доводят рН до 9,6, перемешивают, далее доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.

**Определение подлинности
аллергенов**

**ОФС.1.7.2.0034.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения подлинности (выявления специфических аллергенных компонентов) препаратов аллергенов, представляющих собой водно-солевые экстракты, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Принцип твердофазного иммуноферментного метода анализа изложен в ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Исследуемый препарат сорбируют в лунках полистиролового планшета. На аллергосорбент наносят образцы специфических сывороток крови, содержащие специфические IgE-антитела к данному аллергену. В результате образуется комплекс антиген-антитело (АГ-АТ). К образовавшемуся в лунке планшета комплексу (АГ-АТ) добавляют конъюгат – моноклональные анти-IgE-антитела, меченные пероксидазой, и индикатор – тетраметилбензидин (ТМБ) в субстратном буфере. В лунках планшета с положительной реакцией проявляется цветное окрашивание.

Оптическую плотность растворов в лунках планшета оценивают фотометрическим методом.

Оценку уровня реакции осуществляют по показателям оптической плотности четырех разведений референс-сыворотки (1:1; 1:5; 1:25; 1:50, которые соответствуют 4, 3, 2 и 1 классу специфических IgE-антител.

Учет результатов реакции проводят с помощью референс-системы, состоящей из референс-аллергена (аллерген из пыльцы амброзии) и референс-сыворотки (сыворотка крови больных с содержанием IgE-антител к аллергену из пыльцы амброзии на уровне не менее 4 класса).

АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ (получение и оценка уровня IgE-антител)

Венозную кровь для получения аллергенспецифических сывороток получают от больных, страдающих аллергическими заболеваниями, с положительными кожными пробами, специфичность которых подтверждена. Пробы крови от каждого больного в количестве 10–15 мл отбирают в стерильные химические пробирки и помещают на 1 ч в термостат при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а затем на 16–18 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$.

Образовавшийся сгусток крови отделяют от стенок пробирок стеклянной палочкой. Сыворотку осторожно отделяют от сгустка. Если в сыворотке присутствуют примеси форменных элементов крови, их удаляют центрифугированием. Полученную сыворотку хранят при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$ в течение 5 дней или при температуре минус 40 $^\circ\text{C}$ до 1 года.

Уровень специфических IgE-антител оценивают с помощью набора реагентов для количественного определения специфических IgE-антител согласно инструкции по применению набора.

Для оценки подлинности препаратов применяют только сыворотки крови, содержащие аллергенспецифические антитела к исследуемым аллергенам на уровне 3–4 класса, которые далее используют в качестве положительного контроля.

Примечания.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

1. Испытуемый препарат – лекарственная форма аллергена или аллергоида.

2. Референс-аллерген – стандартный образец аллергена из пыльцы амброзии.
3. Референс-сыворотка – сыворотка крови от пациентов с амброзийным поллинозом, имеющая уровень специфических IgE-антител, соответствующий 4 классу.
4. Положительный контроль – аллергенспецифические сыворотки от пациентов с аллергическими заболеваниями, имеющие уровень специфических IgE-антител к исследуемому аллергену, соответствующий 3–4 классам.
5. Отрицательный контроль – сыворотка крови, не содержащая аллергенспецифических IgE-антител; также используется для разведения референс-сыворотки.
6. 0,05 М буферный раствор натрия карбоната – буферный раствор для сорбции.
7. Система тетраметилбензидин (ТМБ) – субстрат пероксидазы.
8. Конъюгат – мышинные моноклональные антитела к IgE человека, меченные пероксидазой, концентрированные.
9. Разводящий и промывающий раствор – фосфатно-солевой буферный раствор с твином 20 концентрированный (рН 7,1–7,3).
10. Стоп-реагент – 10 % раствор серной кислоты.
11. Вода очищенная.

ОБОРУДОВАНИЕ

1. Многоканальный фотометр вертикального сканирования для 96-луночных планшетов с длиной волны 450 нм.
2. Термостат $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
3. Холодильник $(8 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
4. Автоматические или электронные дозаторы с переменным объемом (от 50 до 5000 мкл).
5. Прозрачные разборные 96-луночные планшеты с высокими сорбционными свойствами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

- 1) 0,01 М буферный раствор натрия карбоната (рН 9,5). Смешивают 2 мл 0,05М раствора натрия карбоната с 8 мл воды очищенной. Полученный раствор используют на один планшет для ИФА. Хранят при температуре $(8 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 1 сут.
- 2) Раствор тетраметилбензидина (ТМБ). Смешивают 2,5 мл ТМБ пероксидазы субстрата с 2,5 мл раствора В пероксидазы субстрата (расходуют на один планшет для ИФА). Раствор готовят за 10 мин до внесения в планшет (хранению не подлежит).
- 3) Приготовление рабочих растворов реагентов (растворы №№ 1-2, растворы референс-сыворотки) – приведено в табл. 1.

Таблица 1 – Приготовление рабочих растворов реагентов

Рабочие растворы	Приготовление (на 1 планшет)	Хранение
Разводящий и промывающий раствор (№1)	50 мл фосфатно-солевого буферного раствора концентрированного с твином довести до 500 мл водой очищенной (рН 7,2–7,4)	При температуре (8 ± 1) °С в течение суток
Раствор конъюгата (№2)	0,1 мл мышинных моноклональных антител к IgE человека концентрированных, меченных пероксидазой, довести до необходимой концентрации рабочим раствором № 1	Готовить непосредственно перед применением
• Раствор А (без разведения)	Растворы референс-сыворотки Референс-сыворотка с уровнем специфических IgE-антител 4 класса	При температуре (5 ± 1) °С в течение суток
• Раствор В (1:5)	К 0,1 мл раствора А добавляют 0,4 мл отрицательного контроля	-«-»
• Раствор С (1:25)	К 0,05 мл раствора А добавляют 0,95 мл отрицательного контроля	-«-»
• Раствор D (1:50)	К 0,05 мл раствора В добавляют 0,450 мл отрицательного контроля	-«-»

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ПОДЛИННОСТИ ПРЕПАРАТОВ АЛЛЕРГЕНОВ

Подготовка аллергенов к сорбции. Испытуемый препарат и референс-аллерген амброзии с помощью буферного раствора для сорбции разводят до концентрации белкового азота, равной 1000 ± 250 PNU/мл.

Сорбция препаратов. Референс-аллерген в объеме 100 мкл вносят в первые два вертикальных ряда планшета. Во все лунки с 3 по 12 вертикальных рядов (стрипов) вносят растворы тестируемых аллергенов (или

аллергоидов) в объеме 100 мкл (по 1 стрипу на одну тестируемую серию препарата).

Планшет закрывают крышкой и инкубируют 16–18 ч при температуре $(8\pm 1)^\circ\text{C}$.

После инкубации содержимое лунок планшета удаляют и промывают 3 раза промывающим и разводящим раствором (по 200 мкл на лунку).

Примечание.

Аллергоид тестируется параллельно на одном планшете с одноименным аллергеном. Количество стрипов с аллергеном и аллергоидом должно быть одинаковым. Микст-аллерген/аллергоид тестируется параллельно не менее чем с 3 аллергенами, входящими в его состав.

Методика проведения твердофазного ИФА

1. Во все лунки 1 вертикального ряда (контроль конъюгата) вносят по 100 мкл раствора № 1, в оставшиеся лунки остальных рядов – по 50 мкл этого же раствора.

2. Во 2 ряд вносят по 50 мкл растворов референс-сыворотки: в лунки А, В – раствор А; в лунки С, D – раствор В; в лунки Е, F – раствор С; в лунки G, H – раствор D.

3. В оставшиеся ряды вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контролей: в лунки А–F – одноимённые положительные сыворотки к тестируемому препарату, в лунки G, H – сыворотку крови, не содержащую аллергенспецифических IgE- антител (отрицательный контроль).

4. Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на 1 ч.

5. После инкубации жидкость из лунок удаляют и в каждую лунку вносят по 200 мкл рабочего раствора № 1 (промывающий и разводящий раствор) на 2–3 мин, после чего жидкость вновь удаляют. Процедуру отмывки повторяют не менее 3 раз.

6. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора № 2 (конъюгат) и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

7. Отмывку планшета проводят согласно п. 5, повторив процедуру не менее 5 раз.

8. Во все лунки планшета вносят по 50 мкл раствора ТМБ. Планшет помещают в тёмное место и выдерживают в течение 15–20 мин при температуре $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

9. Реакцию останавливают добавлением по 25 мкл стоп-реагента во все лунки и проводят учет результатов. В лунках, где прошла реакция, появится окрашивание разной степени интенсивности. Лунки первого ряда (контроль конъюгата) должны оставаться неокрашенными.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов проводят фотометрически при длине волны 450 нм в течение 10 мин после остановки реакции. Вычисляют средние арифметические показатели оптической плотности (ОП) одноимённых лунок.

Критерии приемлемости результатов:

- среднее значение показателей ОП в лунках с контролем конъюгата (КК) не превышает 0,10 (визуально окрашивания лунок не видно);
- среднее значение показателей ОП в лунках с референс-сывороткой без разведения (А) больше 1,0, но меньше 2,5;
- соотношение средних показателей ОП с разведениями референс-сыворотки (растворы А, В, С, D) следующие: ОП раствора А > ОП раствора В > ОП раствора С > ОП раствора D;
- среднее значение показателей ОП раствора D в 1,5–2,0 раза больше среднего значения показателей ОП отрицательного контроля.

Рассчитывают уровень специфических IgE-антител в аллергенспецифических сыворотках (положительный контроль) (табл. 2).

Таблица 2 – Соответствие классов IgE-антител и показателей оптической плотности

Уровень специфических IgE-антител (классы)	Интервалы оптической плотности (ОП) растворов референс-сыворотки
4	От ОП лунок А и выше
3	От ОП лунок В до А
2	От ОП лунок С до В
1	От ОП лунок D до С
0	Меньше ОП лунок D

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллерген следует считать подлинным (выявлены специфические аллергенные компоненты), если уровень IgE - антител в специфической сыворотке (положительный контроль) будет не менее 2 класса.

Аллергоид (модифицированный аллерген) следует считать подлинным (выявлены специфические аллергенные компоненты), если уровень IgE - антител в специфической сыворотке (положительный контроль) будет не менее 1 класса.

Пример: оценка подлинности аллергена из пыльцы полыни горькой и аллергоида пыльцевого полыни горькой.

Тестируемые препараты:

- аллерген из пыльцы полыни горькой (10000 PNU/мл);
- аллергоид пыльцевой полыни горькой (10000 PNU/мл).

Контрольные сыворотки:

- положительный контроль – сыворотка крови, содержащая специфические IgE-антитела к аллергену из пыльцы полыни горькой (уровень антител 3 класс);
- отрицательный контроль – сыворотка крови, не содержащая специфических IgE-антител к пыльце растений.

Последовательность проведения анализа

Приготовление рабочих растворов (раздел «Приготовление растворов»).

Аллерген из пыльцы полыни, аллергоид пыльцевой полыни горькой и референс-аллерген амброзии с помощью буферного раствора для сорбции разводят до концентрации белкового азота, равной 1000 ± 250 PNU/мл.

Референс-аллерген в объеме 100 мкл вносят в первые два вертикальных ряда планшета. В лунки вертикального ряда 3 вносят раствор аллергена из пыльцы полыни в объеме 100 мкл, ряда 4 вносят раствор аллергоида пыльцевого полыни в объеме 100 мкл (схема заполнения планшета приведена в табл. 3).

Таблица 3 – Схема заполнения планшета

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>	КК	А	АС	АС								
<i>B</i>	КК	А	АС	АС								
<i>C</i>	КК	В	АС	АС								
<i>D</i>	КК	В	АС	АС								
<i>E</i>	КК	С	АС	АС								
<i>F</i>	КК	С	АС	АС								
<i>G</i>	КК	Д	ОС	ОС								
<i>H</i>	КК	Д	ОС	ОС								
	Референс-аллерген	Референс-аллерген	Аллерген полыни	Аллергоид полыни								

Примечание: 1,2,3,4 – ряды лунок планшета;

КК – контроль конъюгата - «холостая» проба;

А, В, С, Д – растворы референс-сыворотки;

АС – аллерген-специфическая сыворотка (положительный контроль);

ОС – отрицательная сыворотка (отрицательный контроль);

Планшет закрывают крышкой и инкубируют 16–18 ч при температуре $(8 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в холодильнике.

Во все лунки 1 вертикального ряда (контроль конъюгата) вносят по 100 мкл раствора № 1, в оставшиеся лунки остальных рядов – по 50 мкл этого же раствора.

Во 2 ряд вносят по 50 мкл растворов референс-сыворотки: в лунки А,

В – раствор А; в лунки С, D – раствор В; в лунки Е, F – раствор С; в лунки G, H – раствор D.

В ряды 3 и 4 вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контроля: в лунки А–F – аллергенспецифическая сыворотка (АС), содержащая 3 класс IgE-антител к аллергену полыни, в лунки G,H – не содержащую IgE-антител сыворотку.

Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

По истечении времени инкубации жидкость из лунок удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором. В каждую лунку вносят по 200 мкл раствора № 1 на 2–3 мин, после чего жидкость вновь удаляют. Процедуру отмывки повторяют не менее 3 раз.

В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора №2 (конъюгат) и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

Отмывку планшета проводят согласно п. 6, повторив процедуру не менее 5 раз.

Во все лунки планшета вносят по 50 мкл раствора ТМБ. Планшет помещают в тёмное место и выдерживают в течение 15-20 мин при температуре $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента по 25 мкл во все лунки и проводят учет результатов. Время между остановкой реакции и учётом результатов не должно превышать 10 мин.

В лунках, в которых прошла реакция, должно появиться окрашивание разной степени интенсивности. Лунки первого ряда (контроль конъюгата) должны оставаться неокрашенными.

Учёт результатов

Учёт результатов проводят фотометрически при длине волны 450 нм.

Вычисляют средние арифметические показателей оптической плотности (ОП) одноимённых лунок и заполняют по табл. 4.

Таблица 4 – Результаты анализа

	Показатели ОП	Уровень специфических IgE - антител (классы)
Растворы референс-сыворотки		
A	1,99±0,35	4
B	1,09±0,22	3
C	0,56±0,21	2
D	0,29±0,14	1
Отрицательный контроль	0,08±,00	0
Положительный контроль (аллерген)	1,1±0,15	3
Положительный контроль (аллергоид)	0,89±0,17	2

Аллерген из пыльцы полыни горькой и аллергоид пыльцевой полыни горькой считаются подлинными (выявлены специфические аллергенные компоненты, присутствующие в тестируемых препаратах).

**Лекарственные препараты
из плазмы крови человека**

**ОФС.1.8.1.0001.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на препараты крови человека, полученные из плазмы крови здоровых доноров, соответствующей требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования». Препараты крови человека выпускают в жидком или сухом виде.

Препараты крови человека включают:

- препараты альбумина человека;
- препараты иммуноглобулинов человека;
- препараты факторов свертывания крови, содержащие один из факторов свертывания крови или их комбинацию.

Препараты крови человека получают методами фракционирования, хроматографии и другими.

Препараты крови не содержат антибиотиков и консервантов.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов крови человека используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования». Доноры крови и плазма крови должны проходить обследование в соответствии с действующими нормативными правовыми документами. Каждая индивидуальная порция плазмы должна контролироваться на отсутствие маркеров инфекций, переносимых при гемотрансфузиях. Для заготовки плазмы крови необходимо использование разрешенных в установленном порядке гемоконсервантов.

Производство препаратов крови должно гарантировать сохранение структуры и функции белков крови, обеспечивать специфическую и вирусную безопасность препаратов и исключать контаминацию чужеродными агентами.

Для предотвращения попадания вирусов в готовые лекарственные формы предусматривается введение в технологию производства нескольких стадий вирусной инаktivации и/или элиминации вирусов, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов.

ИСПЫТАНИЯ

Препараты крови человека, используемые в лекарственных формах для парентерального применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» по показателям «Стерильность», «Пирогенность», «Бактериальные эндотоксины», «рН», «Механические включения» (видимые механические включения), выдерживать требования к вспомогательным веществам.

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата.

Подлинность. Подлинность подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека методом иммуноэлектрофореза в геле в соответствии с ОФС «Имуноэлектрофорез в агаровом геле», методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Имунодиффузия в геле», при необходимости активностью специфического компонента и другими методами.

Время получения восстановленного препарата (для лиофилизированных препаратов). Указывают время растворения препарата, приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения.

Потеря в массе при высушивании или вода (для лиофилизированных препаратов). Указывают требования к потере в массе при высушивании или воде. Определение проводят в соответствии с ОФС

«Потеря в массе при высушивании» или в соответствии с ОФС «Определение воды».

Извлекаемый объем (для жидких лекарственных форм). Извлекаемый объем должен быть не менее номинального и должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейных статьях. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Белок. Указывают требования содержания белка. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность (электрофоретический состав). Указывают требования электрофоретической однородности препаратов альбумина и иммуноглобулинов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Специфическая активность (кроме препаратов альбумина). Указывают содержание специфического компонента. Определение проводят по методике, указанной в фармакопейной статье, с использованием соответствующих стандартных образцов.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике

здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. Первичная упаковка должна обеспечивать сохранение заявленных свойств препарата в течение регламентированного срока годности и быть разрешена для упаковки лекарственных средств при соответствующих методах их введения. Вместимость ее для лиофилизированных препаратов, как правило, должна обеспечивать возможность внесения регламентированного объема растворителя и последующего полноценного перемешивания содержимого.

На первичной упаковке указывают наименование лекарственного препарата, наименование или логотип производителя, номер серии, дату производства, дату истечения срока годности («годен до»), дозировку или концентрацию, или активность.

На потребительской (внешней) упаковке указывают наименование лекарственного препарата, наименование и адрес производителя, лекарственную форму, номер серии, дату производства, дату истечения срока годности («годен до»), способ применения, дозировку или концентрацию, или активность, информацию о составе, количестве лекарственного препарата в упаковке, условия хранения, условия отпуска, номер регистрационного удостоверения, штриховой код, предупредительные надписи.

При вложении в потребительскую (внешнюю) упаковку дополнительных компонентов (растворитель лиофилизированного препарата

указывают наименование дополнительного компонента, концентрацию, информацию о составе, объем, номер серии. При вложении дозирующих устройств, изделий медицинского назначения и др. на потребительской (внешней) упаковке дополнительно указывают сведения об их наличии.

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Иммунобиологические
лекарственные препараты**

**ОФС.1.8.1.0002.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологические лекарственные препараты. Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) – лекарственные препараты биологического происхождения, предназначенные для иммунологической диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний. Введение ИЛП в организм человека приводит к развитию искусственно приобретенного активного (вакцины, анатоксины) или пассивного (иммуноглобулины человека нормальные и специфические, в том числе, гипериммунные плазмы, гетерологичные иммуноглобулины и сыворотки и моноклональные антитела) иммунитета. К ИЛП относятся и другие лекарственные препараты биологической природы (бактериофаги, пробиотики, цитокины, включая интерфероны, аллергены и аллергоиды, ферменты микробов), а также лекарственные препараты, произведенные путем биотехнологических процессов, в том числе, с применением методов генетической инженерии.

По своему назначению ИЛП подразделяют на лечебные и лечебно-профилактические, собственно профилактические и диагностические.

ИЛП могут содержать живые или инактивированные микробы (бактерии, вирусы), их антигены, в том числе, белки, пептиды или производные белков и пептидов, гликопротеины; антитела к ним и другие действующие вещества биологического происхождения (например, цитокины, моноклональные антитела, рецепторы клеток, рекомбинантные

белки, подобные факторам свертывания из плазмы крови, вакцины на основе рекомбинантных белков и т.п.).

ИЛП выпускают в виде монопрепаратов и комплексных (комбинированных или ассоциированных) препаратов.

В состав ИЛП могут входить вспомогательные вещества различного функционального назначения (адьюванты, сорбенты, консерванты, стабилизаторы, наполнители и др.), разрешенные в производстве ИЛП.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство ИЛП отличается сложностью и многообразием технологических процессов (например, культивирование штаммов микроорганизмов и клеток эукариот, экстракция веществ из биологических тканей и крови человека и животных, применение технологии рекомбинантной ДНК, гибридной технологии и др.). Производство ИЛП должно осуществляться в условиях соблюдения надлежащих требований организации производства и контроля качества лекарственных средств. При изменениях производственного процесса, введении нового регламента или способа производства, оказывающих влияние на качество ИЛП и/или стабильность и воспроизводимость процесса, представляются доказательства их пригодности для серийного производства и материалы по валидации.

Качество ИЛП обеспечивается следующими основными условиями:

- в производстве используют только изученные, генетически стабильные производственные штаммы микробов, охарактеризованные и депонированные в официальных коллекциях, ежегодно контролируемые по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями; при этом генетическая стабильность производственного штамма является критерием, ограничивающим число пассажей микроба;
- используют адекватные питательные среды, обладающие высокими ростовыми свойствами (сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны иметь сертификаты,

подтверждающие их качество);

- используют культуры клеток, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, депонированные в официальных коллекциях и разрешенные к использованию для производства (при культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека, а также антибиотиков группы пенициллина);
- куриные эмбрионы, используемые для производства ИЛП, получают только от здоровой птицы из птицеводств, благополучных по инфекционной заболеваемости кур; качество поставляемых эмбрионов должно подтверждаться ветеринарными свидетельствами и справками ветеринарной лаборатории о санитарном состоянии поголовья, включающими микробиологические и биохимические контроли;
- животные и птицы, используемые для производства ИЛП, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионных и других болезней, опасных для человека, что подтверждается ветеринарными свидетельствами и справками ветеринарной лаборатории о санитарном состоянии поголовья, включающими микробиологические и биохимические контроли;
- при производстве ИЛП из плазмы и клеток крови и органов человека должны соблюдаться требования, предъявляемые к состоянию здоровья донора;
- ИЛП по всем показателям качества должны соответствовать требованиям нормативной документации.

Субстанции, используемые при приготовлении лекарственных форм, выпускаемые на разных производствах, должны быть зарегистрированы в установленном порядке.

При производстве и/или испытании препарата с использованием микроорганизмов I-II или III-IV группы патогенности (опасности) работу проводят при соблюдении соответствующих санитарно-эпидемиологических правил.

Некоторые испытания, являющиеся критическими стадиями/точками в технологии производства, должны быть определены на промежуточных этапах производства. Например, к таким испытаниям относится определение герметизации и наличия вакуума.

Герметизация и наличие вакуума

1. Герметизацию ампул и флаконов определяют физическим методом. Флаконы и ампулы должны быть герметичны, испытанию подлежат все флаконы и ампулы серии ИЛП.

Флаконы и ампулы с препаратом помещают в кассету и погружают в емкость, заполненную водой очищенной, подкрашенной раствором метиленовой сини (образцы должны быть полностью покрыты водой). Емкость закрывают крышкой, создают избыточное давление ($0,7 \pm 0,05$ МПа) и выдерживают 1-3 мин. Затем устанавливают атмосферное давление, емкость открывают, вынимают кассету с образцами и просматривают на наличие во флаконах воды, подкрашенной раствором метиленовой сини. Образцы, содержащие подкрашенную воду, бракуют.

2. Наличие вакуума в ампулах определяется визуально по цвету свечения газовой среды (определение цвета свечения газовой среды ампул с ИЛП при возбуждении её высокочастотным электрическим полем с помощью аппаратов типа д'Арсонваль или Тесла). При контроле качества герметизации ампул под вакуумом определяющим параметром является давление воздуха в ампулах. Диапазон измеряемых величин от 10 Па до 100 кПа. Допустимыми величинами являются давления порядка 10 Па—1 кПа. Частота электрических колебаний составляет от 20 до 50 кГц, напряжение - от 15 до 20 кВ. В зависимости от величины давления (глубины вакуума) цвет свечения будет различным.

Контролю на наличие вакуума подвергают все ампулы серии. При хранении ампул и флаконов с препаратом при пониженной температуре, перед началом испытаний их выдерживают при комнатной температуре.

Определение величины давления проводят в соответствии с Таблицей

1.

Таблица 1 - Зависимость цвета свечения от величины давления

Величина давления	Цвет свечения
10 — 100 Па	бледно-голубое
100 — 1000 Па	розово-голубое
1 — 5кПа	фиолетовое
5 — 100кПа	нет свечения

При контроле качества герметизации ампул с ИЛП, запаянных после заполнения защитным газом при атмосферном давлении, испытанию подлежат все ампулы серии. При проведении анализа не следует прикасаться высокочастотным электродом к месту запайки ампул.

Требования к величине давления (глубине вакуума) регламентируются фармакопейными статьями или нормативной документацией.

Контроль флаконов осуществляют выборочно, объем выборки составляет $0,5 \times \sqrt{N}$, где N - число флаконов в серии. При обнаружении в выборке хотя бы одного негерметичного флакона, проводят контроль всех флаконов серии.

ИЛП выпускают в различных лекарственных формах: лиофилизаты, порошки, растворы, суспензии, таблетки, капсулы, гранулы, суппозитории, мази. Лيوфилизаты могут быть выпущены в комплекте с растворителем, разрешенным к медицинскому применению, в соответствующей дозировке при данном способе применения. Растворитель не должен влиять на качество препарата.

ИСПЫТАНИЯ

Методики, используемые для проведения испытаний, должны быть описаны максимально подробно с указанием квалификации реактивов, реагентов, лабораторного оборудования, приборов, требований к животным, штаммам микробов и культур клеток и т.д.

Требования к чувствительности методов испытаний ИЛП и результатам исследований должны соответствовать рекомендациям ВОЗ.

ОФС «Таблетки», «Суппозитории», «Порошки», «Капсулы» регламентируют показатели качества ИЛП соответствующих лекарственных форм.

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата.

Подлинность. Подтверждают различными лабораторными методами, позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат: биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими или физико-химическими.

Прозрачность. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

В разделе «Прозрачность» или «Прозрачность восстановленного раствора» указывают требования к жидкому или растворенному препарату, прозрачности, наличию опалесценции, взвеси или осадка. При необходимости растворения препарата указывают состав и объем растворителя.

Цветность. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

В разделе «Цветность» или «Цветность восстановленного раствора» указывают требования к цветности раствора препарата, полученного при использовании растворителя, определенного инструкцией по применению, методы определения и оценки данных показателей. Окраску жидкостей определяют визуально в сравнении с соответствующими эталонами.

Механические включения. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Указывают отсутствие видимых и допустимое содержание невидимых частиц и методы их контроля.

Контроль сорбированных препаратов и корпускулярных бактериальных

вакцин проводят визуально.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов или порошков). Время восстановления препарата указывается в фармакопейной статье. В емкость с препаратом с помощью пипетки или шприца для инъекций осторожно прибавляют необходимое количество растворителя. В течение нормированного времени содержимое емкости должно полностью раствориться или диспергироваться с образованием раствора или суспензии. В фармакопейной статье указывают условия проведения анализа (применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, температуру растворителя, необходимость встряхивания).

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Указывают применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, условия распадаемости (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Температура и время плавления или время полной деформации (для суппозитория). Для суппозитория, изготовленных на липофильной основе, определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозитория на липофильной основе».

рН. Указывается допустимый интервал значений рН. Уточняются условия подготовки испытуемого образца; разведение (при необходимости); растворение с указанием объема и названием растворителя. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Извлекаемый объем должен быть не менее номинального и должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейных статьях. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании или **Вода**. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или «Определение воды».

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, суппозитория, содержимого капсул, дозированных порошков и лиофилизатов). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Стерильность. Иммунобиологические лекарственные препараты в инъекционных лекарственных формах и глазных каплях должны быть стерильными. Испытание стерильности проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Микоплазмы. При необходимости в фармакопейную статью включают испытания на отсутствие микоплазм. Определение проводят в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Микробиологическая чистота. Допустимые количества непатогенных микроорганизмов указывают в фармакопейных статьях. Испытание на микробиологическую чистоту, которому подлежат неинъекционные лекарственные формы ИЛП, проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Отсутствие посторонней микрофлоры. Испытанию подлежат живые бактериальные и вирусные вакцины и пробиотики (лиофилизаты во флаконах, порошки). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в фармакопейной статье не указан иной метод испытания.

Пирогенность. Испытанию на пирогенность подлежат лекарственные формы ИЛП, предназначенные для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах указывают в фармакопейной статье.

Бактериальные эндотоксины. Испытанию на бактериальные эндотоксины подлежат лекарственные формы ИЛП, предназначенные для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины». Исключение составляют препараты, содержащие в своем составе бактериальные эндотоксины в качестве активного компонента. Требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах, указывают в фармакопейной статье.

Аномальная токсичность. Испытания аномальной токсичности препаратов, предназначенных для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения, проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Пробоподготовку препаратов, дозы и способ введения указывают в фармакопейной статье. Определение аномальной токсичности других лекарственных форм описывают в фармакопейной статье.

Специфическая безопасность. Испытание специфической безопасности должно включать метод (методы) контроля *in vitro* и/или *in vivo*, результаты которых свидетельствуют об отсутствии вирулентных (токсических) свойств, присущих исходным микробным штаммам, используемым для изготовления активного компонента (компонентов) препарата.

Для неживых инаktivированных или субъединичных (например, химических вакцин) бактериальных и вирусных препаратов к таким показателям относят отсутствие жизнеспособных микробов производственного штамма. Для анатоксинов – отсутствие следов необезвреженного токсина; для бактериофагов – отсутствие бактерий производственных штаммов; естественного интерферона – отсутствие вируса-индуктора и т.п. Соответствующие испытания должны быть проведены с использованием максимально чувствительных методов. Определение специфической безопасности описывают в фармакопейной статье.

Специфическая безвредность. Испытанию подвергают неинъекционные препараты, содержащие живые микробы. Определение специфической безвредности пробиотиков проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля, и их количество, дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения; учитываемые показатели.

Специфическая активность. Испытание проводят с помощью методов количественного определения содержания антигена или другого активного компонента. Методы определения специфической активности *in vitro* и/или *in vivo* зависят от вида ИЛП и с наибольшей достоверностью характеризуют его эффективность при практическом применении. Определение специфической активности должно осуществляться с использованием соответствующих стандартных образцов (референс-препаратов), откалиброванных по отношению к Международным стандартным образцам (при наличии последних).

При использовании математических методов расчета результатов анализа в фармакопейной статье приводят соответствующую формулу с расшифровкой обозначений, а в случае необходимости, и пример расчета. Если расчет осуществляется с применением компьютерной программы, приводят соответствующую ссылку.

Химические показатели. В ИЛП определяют количественное содержание белка, нуклеиновых кислот, полисахаридов, сахаров, фосфора и т.п., в случае, если определение этих показателей не предусмотрено разделами «Подлинность», «Специфическая безопасность», «Специфическая активность». Каждый определяемый показатель излагают в самостоятельном разделе.

Вещества, вносимые в препарат. Определяют количественное содержание веществ, используемых для инактивации бактерий или вирусов,

сорбента, консерванта, стабилизатора и др. Каждый определяемый показатель излагают в самостоятельном разделе.

Примеси. Определяют допустимое содержание в ИЛП (единице объема или массы) веществ, в том числе и биологической природы, которые могут в него попасть в процессе производства или образоваться в процессе хранения. Например, содержание в иммуноглобулинах других белков сыворотки крови; наличие вирусов-контаминантов биологических субстратов (клеточные культуры, сыворотки и др.); содержание овальбумина в препаратах, для изготовления которых используют эмбрионы птиц; содержание ионов аммония в сывороточных препаратах; содержание белка и ДНК клеток-продуцентов в ИЛП, полученных методом генной инженерии. Содержание белка и ДНК клеток-продуцентов в ИЛП не должно превышать показателей, определенных международными требованиями. Допустимо определение примесей в процессе производства до внесения вспомогательных веществ.

Вирусная безопасность. В ИЛП, полученных из крови, плазмы крови, органов и тканей человека, должна быть подтверждена вирусная безопасность в разделах: **Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg); Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, 2), антиген р24 ВИЧ; Антитела к вирусу гепатита С.**

Производственные штаммы микроорганизмов и штаммы для контроля. При использовании производственных штаммов микроорганизмов и штаммов для контроля указывают их наименование на латинском языке, место депонирования, номер депозита, условия хранения, допустимое количество пассажей (при необходимости) с указанием условий их проведения и субстрата для культивирования. При необходимости указывают дополнительные к паспортным данным требования к характеристике штамма (например, LD₅₀).

Растворители, выпускаемые в комплекте с лиофилизированным препаратом. В качестве растворителей лиофилизированных препаратов

используют растворители, разрешенные к медицинскому применению при соответствующем пути введения, не влияющие на качество препарата. Требования к качеству растворителя должно быть определено в фармакопейной статье, в которую должны быть включены все показатели качества для контроля растворителя.

Упаковка. Первичная упаковка ИЛП должна обеспечивать сохранение заявленных свойств препарата в течение регламентированного срока его годности и быть разрешена для упаковки лекарственных средств при соответствующих методах их введения. Вместимость ее для лиофилизированных препаратов, как правило, должна обеспечивать возможность внесения регламентированного объема растворителя и последующего полноценного перемешивания содержимого. Для упаковки инъекционных форм препаратов в многодозовой расфасовке не рекомендуется использовать ампулы.

Маркировка. На первичной упаковке указывают наименование лекарственного препарата, наименование или логотип производителя, номер серии, дату производства, дату истечения срока годности («годен до»), дозировку или концентрацию, или активность.

На потребительской (внешней) упаковке указывают наименование лекарственного препарата, наименование и адрес производителя, лекарственную форму, номер серии, дату производства, дату истечения срока годности («годен до»), способ применения, дозировку или концентрацию, или активность, информацию о составе, количестве лекарственного препарата в упаковке, условия хранения, условия отпуска, номер регистрационного удостоверения, штриховой код, предупредительные надписи.

При вложении в потребительскую (внешнюю) упаковку дополнительных компонентов (растворитель лиофилизированного препарата, тест-контрольная жидкость, разведенная сыворотка для постановки кожной пробы и т.п.), указывают наименование дополнительного компонента,

концентрацию, информацию о составе, объеме, номер серии. При вложении дозирующих устройств, изделий медицинского назначения и пр. на потребительской (внешней) упаковке дополнительно указывают сведения об их наличии.

На потребительскую (внешнюю) упаковку лекарственных препаратов, полученных из крови, плазмы крови, органов и тканей человека, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. Условия хранения ИЛП должны обеспечивать сохранность всех свойств препарата на протяжении регламентированного срока его годности. Температурный режим хранения, как правило, должен находиться в пределах от 2 до 8⁰С, если в фармакопейной статье нет других указаний. Адсорбированные на адъювантах препараты не должны подвергаться замораживанию.

Транспортирование. Температурные и другие условия транспортирования, как правило, не должны отличаться от таковых для условий хранения. Возможность транспортирования препарата при другом температурном режиме должна быть обоснована соответствующим фактическим материалом. При этом в соответствующем разделе нормативной документации должно содержаться указание о правилах фиксирования продолжительности данного режима транспортирования.

**Иммуноглобулины
человека**

**ОФС.1.8.1.0003.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических препаратов – иммуноглобулины человека, которые представляют собой иммунологически активную белковую фракцию сыворотки или плазмы крови человека, несущую антительную активность различной специфичности. Препараты иммуноглобулинов представляют собой жидкость или порошок (гигроскопичную массу), содержащие иммуноглобулины, преимущественно класса G (Ig G) – антитела против различных возбудителей бактериальных и вирусных инфекций и/или их токсинов.

Сырьем для производства иммуноглобулинов человека является плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма для фракционирования».

Иммуноглобулины человека подразделяют на:

- иммуноглобулины нормальные (для внутримышечного, подкожного, внутривенного введения и энтерального применения), которые используют для специфической профилактики бактериальных и вирусных инфекций, для повышения неспецифической резистентности организма, а также для лечения инфекционно-токсических и вирусных заболеваний;
- иммуноглобулины специфические, применяемые для профилактики и/или лечения определенной инфекции;

– иммуноглобулины специального назначения (для лечения аллергических заболеваний и др.)

В состав иммуноглобулинов человека входит не менее 95% иммуноглобулинов класса G.

Иммуноглобулины человека не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Иммуноглобулины человека изготавливаются из пула плазмы крови, полученной не менее чем от 1000 здоровых доноров (для специфических иммуноглобулинов количество доноров не ограничено), методами с доказанной эффективностью выделения иммуноглобулиновой фракции и обеспечения вирусной и специфической безопасности.

Производство иммуноглобулинов человека должно гарантировать сохранение структуры и функции белков иммуноглобулинов, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препаратов, исключающих контаминацию чужеродными агентами и включающих стадию/стадии производства, которые обеспечивают инактивацию и элиминацию инфекционных агентов. Антибактериальная и противовирусная эффективность препаратов должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5-5,5% и не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0 – 16,0%).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Жидкий препарат – бесцветный или со светло-желтой окраской, прозрачный или слабо опалесцирующий раствор; лиофилизированный препарат – белый или светло-желтый порошок или аморфная гигроскопическая масса (если в фармакопейной статье или нормативной документации не указаны другие требования).

Подлинность. Подлинность подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле. Метод определения указывают в фармакопейной статье или в нормативной документации. В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Время растворения (для лиофилизированных препаратов). Не более 20 мин, если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний. Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

В разделе «Цветность» или «Цветность восстановленного раствора» указывают требования к цветности препарата или раствора, полученного при

использовании растворителя, определенного инструкцией по применению, методы определения и оценки данных показателей.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных препаратов). Не более 3%. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другими валидированными методами, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Перед испытанием лекарственный препарат разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида (pH 7,0-7,2). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для сухих лекарственных форм указывают название растворителя, описывают методику восстановления лекарственного препарата и приводят нормативные требования к восстановленному препарату.

Белок. В нормативной документации указывают нормативные требования. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95% от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. В нормативной документации указывают нормативные требования. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле, используя сыворотку против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Имуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность (для жидких лекарственных форм). Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 4 ч.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины (для парентеральных лекарственных форм). Должен быть апиrogenным или содержать бактериальные эндотоксины в пределах установленных норм. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должен быть не токсичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Содержание антител (специфическая активность). В нормативной документации указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и/или противовирусных антител (минимум против одного возбудителя). Определение проводят по методике, указанной в фармакопейной статье, с использованием соответствующих стандартных образцов.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

**Иммуноглобулины
и сыворотки (антитела)
гетерологичные**

ОФС.1.8.1.0004.15

Взамен ГФ X, ст. 607

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные (далее – сыворотки), которые представляют собой лекарственные средства, содержащие очищенные иммуноглобулины или их фрагменты, полученные из сыворотки или плазмы крови животных различных видов, иммунизированных соответствующими антигенами. Сыворотки содержат специфические антитела, нейтрализующие или связывающие антигены, использованные для иммунизации животных. В качестве антигенов могут служить микробные или другие токсины, бактерии, вирусы, яды (змей, пауков, скорпионов), некоторые ткани человека.

Сыворотки могут содержать антитела к одному (моновалентные сыворотки) или нескольким (поливалентные сыворотки) антигенам. Поливалентные сыворотки получают иммунизацией животного несколькими видами антигенов или объединением нескольких моновалентных сывороток. Сыворотки выпускают в виде жидких или лиофилизированных препаратов, предназначенных для введения внутримышечно, подкожно, внутривенно, а также в спинномозговой канал.

ПРОИЗВОДСТВО

Требования к животным-продуцентам

Животные, используемые для приготовления сывороток, должны быть абсолютно здоровыми и свободными от гельминтов и инфекционных агентов, перечисленных в утвержденном перечне заболеваний, в том числе, от возбудителей заболеваний, специфичных для мест разведения животных. В качестве животных-продуцентов не допускается использование крупного рогатого скота из районов, в которых обнаружено заболевание губчатой энцефалопатией.

Животные, получавшие антибиотики, могут быть использованы для получения сыворотки только после периода времени, необходимого для полного выведения антибиотика из организма. Антибиотики пенициллинового ряда не должны применяться для лечения животных-продуцентов.

Животные-продуценты при поступлении должны пройти карантин, а лошади и крупный рогатый скот (дополнительно) – вакцинацию столбнячным анатоксином.

Иммунизация животных

При иммунизации животных антиген может быть введен с адъювантом. Во время цикла иммунизации проводят постоянный контроль здоровья животных и регулярное определение выработки специфических антител. Если у животных проявляются патологические процессы, не характерные для применяемого антигена, использование всех животных в группе приостанавливают до тех пор, пока не будет установлено, что это не повлияет на безопасность и эффективность конечного продукта. При иммунизации животных-продуцентов живыми микроорганизмами между последней иммунизацией и кровопусканием должен быть выдержан период времени, достаточный для элиминации введенных микроорганизмов.

Сбор крови или плазмы

Сбор крови или плазмы проводят путем венепункции или плазмафереза в условиях асептики. Место для сбора крови или плазмы должно быть изолировано от места содержания животных. Допускается объединение

плазмы, полученной от нескольких животных. Полученная плазма должна быть стерильной.

Получение иммуноглобулинов или их фрагментов

Иммуноглобулины или их фрагменты получают методами солевого фракционирования и ферментной обработки, с использованием различных методов очистки от балластных белков и примесей (хроматографии, мембранной фильтрации, ферментации и других соответствующих химических и физических методов), обеспечивающих получение продукта, свободного от контаминации, агрегатов и фрагментов сывороточных белков, влияющих на безопасность и качество. Технологический процесс получения иммуноглобулинов или их фрагментов должен быть валидирован. Для продуктов, представленных фрагментами иммуноглобулина, для гарантии регламентированной фрагментации указывают методы, подтверждающие правильность установленных нормативных требований.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Жидкий препарат – бесцветный или с желтоватым оттенком, прозрачный или слабо опалесцирующий раствор; лиофилизированный препарат – белый или слегка желтый порошок или аморфная, гигроскопическая масса.

Подлинность. Подлинность подтверждают иммунологическими методами (иммунный электрофорез, метод иммунодиффузии в геле и др.). Для подтверждения подлинности может использоваться метод количественного определения активности.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Указывают метод определения. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветный или с желтоватым оттенком раствор. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Потеря в массе при высушивании. Для лиофилизированных препаратов не более 3%. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Время растворения. Не более 20 мин для лиофилизированных препаратов. Методику определения указывают в нормативной документации.

pH. От 5,0 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Осмоляльность. Не более 240 мОсмол/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность» в препаратах, предназначенных для внутривенного введения с указанием растворителя и его объема.

Содержание белка. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Указывают тест-дозу, допустимые пределы изменений температуры у животных. Вводят 1 мл препарата на 1 кг массы кролика. Для лиофилизированных препаратов указывают растворитель и его объем.

Бактериальные эндотоксины. Нормативные требования, требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах указывают в нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Указывают тест-дозы, способ введения и время наблюдения.

Специфическая активность. Указывают требования к показателю специфической активности и описывают метод ее количественного определения. Специфическую активность жидких препаратов выражают в количестве антител в единице объема. Для лиофилизированных препаратов указывают активность содержимого первичной упаковки или активность, приходящуюся на единицу объема после растворения в определенном объеме растворителя. Количественное содержание антител выражают в Международных единицах (МЕ). Описание метода включает требования к животным (вид, линия, масса, пол, количество); описание схемы и метода введения препарата, указание на использование стандартных образцов (при необходимости), величины используемых доз; требование к реагентам, тест-токсинам и вирусам, их дозам; сроки наблюдения и учитываемые показатели, методы расчета и статистической обработки результатов (при необходимости).

При определении специфической активности методами *in vitro* приводят описание методики, требования к реагентам, учитываемые показатели.

Удельная активность (если предусмотрено). Требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Удельная активность выражается в количестве единиц активности (например, МЕ), на установленное количество белка. Показатель определяют по формуле путем деления активности, приходящейся на единицу объема, на количество белка, находящегося в том же объеме.

Вещества, вносимые в препарат. Если препарат содержит консерванты, стабилизаторы или наполнители, указывают их допустимое количество в единице объема (для жидких препаратов) или содержимого первичной упаковки (для лиофилизированных препаратов) и методы

определения. Количество консерванта не должно быть меньше установленного эффективного минимума и не превышать заявленную величину более чем на 15%.

Стабилизатор. Количество стабилизатора должно быть не меньше 80% и не больше 120% от заявленной величины. Содержание стабилизатора определяют с помощью подходящего физико-химического метода.

Растворители и реагенты, выпускаемые в комплекте с препаратом. В комплекте со специфической сывороткой выпускается сыворотка соответствующего вида животного, разведенная 1:100, которая предназначена для постановки внутрикожной пробы с целью выявления чувствительности человека к лекарственному препарату, если это предусмотрено инструкцией по применению.

В качестве растворителей для лиофилизированных препаратов, используют растворители, разрешенные к медицинскому применению при соответствующем пути введения, которые не влияют на качество препарата. Требования к качеству растворителя должно быть определены в нормативной документации производителя, в которую должны быть включены все показатели качества для контроля растворителя.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. Жидкие лекарственные средства не допускается замораживать.

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, используемый для определения подлинности (видоспецифичности) лекарственных препаратов.

Принцип метода иммунодиффузии в геле заключается в том, что в результате реакции антигена с антителом, взятых в эквивалентном соотношении образуется преципитат в виде линий преципитации.

Подлинность (видоспецифичность) подтверждается образованием линии преципитации с антигенами сыворотки, содержащей только видоспецифичные белки (например, при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека с сывороткой, преципитирующей белки крови человека).

Проведение испытания

Обработанную спиртом стеклянную пластину размером 26×75 мм или 90×120 мм или стеклянную чашку Петри диаметром 100 мм (в соответствии с указаниями нормативной документации) помещают строго горизонтально на предметный столик. Расплавленный агар (температура $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$) наносят на стеклянную пластину (или стеклянную чашку Петри) в количестве, достаточном для формирования слоя толщиной 2,4 – 2,6 мм (например, на стекло размером 26×75 мм необходимо нанести 5,5-6,0 мл). Стеклянную пластину (или стеклянную чашку Петри) на 30 – 40 мин помещают во влажную камеру эксикатора с небольшим количеством воды для застывания

агара.

В застывшем агаровом геле по трафарету готовят лунки для реагентов (рис.1), используя трубки-пробойники, изготовленные из латуни или нержавеющей стали, с заточенным концом со стороны внутреннего диаметра (2–3 мм) или используют стандартные штампы. Расстояние между внешними краями лунок должно быть равно 5 – 6 мм. Агаровые пробки из лунок аккуратно удаляют с помощью поперечно-срезанной пастеровской пипетки, не допуская отслаивания геля от стекла.

Лунки заполняют образцами в соответствии со схемой (рис. 1) в объеме, не превышающем объем лунки (объем вносимых образцов указывают в нормативной документации).

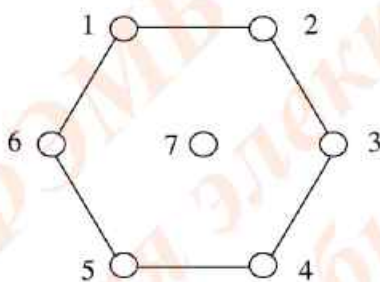


Рисунок 1– Схема нанесения реагентов

1 – сыворотка, преципитирующая видоспецифичные белки (например, белки крови человека при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека);

2 – стандартный реагент (например, контрольная сыворотка крови человека при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека);

3,4,6 – сыворотки, преципитирующие иные белки (например, белки крови лошади, свиньи, крупного рогатого скота при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека);

5 – отрицательный контроль (0,9 % раствор натрия хлорида);

7 – исследуемый препарат.

Стеклянную пластину (или стеклянную чашку Петри) с агаровым гелем помещают во влажную камеру и выдерживают при комнатной температуре в течение 24 ч или при температуре $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч.

Учет результатов проводят визуально путем выявления линий преципитации. Подтверждением специфичности иммунодиффузии является наличие линии преципитации стандартного реагента и соответствующей сыворотки, преципитирующей видоспецифичные белки. Например, при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека должны выявляться линии преципитации сыворотки, преципитирующей белки крови человека, с исследуемым препаратом и с контрольной сывороткой крови человека (рис.2).

линии преципитации

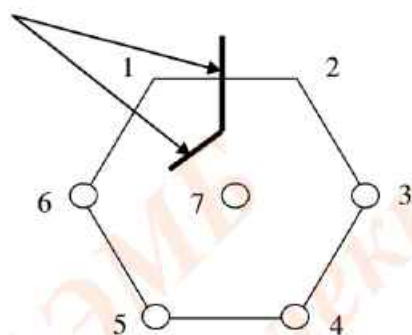


Рисунок 2– Учет полученных результатов при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека

- 1 – сыворотка, преципитирующая белки крови человека;
- 2 – контрольная сыворотка крови человека (стандартный реагент);
- 3 – сыворотка, преципитирующая белки крови лошади;
- 4 – сыворотка, преципитирующая белки крови свиньи;
- 5 – отрицательный контроль (0,9 % раствор натрия хлорида);
- 6 – сыворотка, преципитирующая белки крови крупного рогатого скота;
- 7 – исследуемый препарат.

Примечание

1.Приготовление агарового геля

В химический стакан вместимостью 1000 мл вносят 12,5 г агара, добавляют 500 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и оставляют для набухания геля в течение 1 ч при комнатной температуре. Стакан с содержимым помещают в кипящую водяную баню и выдерживают до полного расплавления агара. Объем раствора геля доводят 0,9 % раствором натрия хлорида до метки и перемешивают. Раствор агара фильтруют через марлю (2 – 3 слоя) и разливают во флаконы. Расплавленный агар должен быть прозрачным.

Срок годности охлажденного агарового геля 1 мес при температуре хранения $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$.

Допустимо применение агарового геля иного состава в соответствии с указаниями в нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Иммуноэлектрофорез
в агаровом геле**

**ОФС.1.8.2.0002.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для исследования антигенного состава биологических материалов, а также для определения чистоты, качественного и количественного состава иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) методом иммуноэлектрофореза (ИЭФ) в агаровом геле, сочетающим методы зонального электрофореза и иммунодиффузию.

В процессе иммуноэлектрофореза в гелях или на пленках из ацетата целлюлозы с помощью методов простой или двойной иммунодиффузии происходит реакция между растворимыми белками и специфическими по отношению к ним преципитирующими антителами. Количественное определение белков можно осуществлять с помощью электрофореза в среде, содержащей антитела (электроиммуноанализ, электроиммунодиффузия, ракетный иммуноэлектрофорез). Антигенную природу белковых компонентов можно исследовать путем их сравнения с известными маркерами.

Эффективность иммунохимических тестов зависит от специфичности используемых антисывороток, а также от их титра и сродства к антигенам.

Обычно иммуноэлектрофорез представляет собой сочетание электрофореза в агаровом (или агарозном) геле с последующей двойной иммунодиффузией в той же среде. При двухмерной двойной иммунодиффузии антиген и антитела, помещенные в круглые или

прямоугольные углубления в геле, мигрируют навстречу друг другу, в результате чего при встрече образуются линии (дуги) преципитации. Положение полос преципитации зависит от коэффициента диффузии антигена, его концентрации относительно антител (скорость диффузии антитела можно рассматривать как постоянную). Определенное соотношение концентраций антигена и антител, которое является оптимальным для образования преципитата называется зоной эквивалентности. При этом получаются четкие линии преципитации.

Концентрация (титр) антител в иммунной сыворотке также может значительно варьировать. Возможна ситуация, при которой зоны эквивалентности для разных компонентов смеси не будут перекрываться. Для подбора эквивалентного соотношения антиген-антитело иммуноэлектрофорез многокомпонентных смесей рекомендуется проводить при нескольких относительных концентрациях антиген-антитело, так как при использовании только одной такой концентрации можно не обнаружить те или иные компоненты.

Метод иммуноэлектрофореза в агаровом геле

Обработанную спиртом стеклянную пластину размером 90x120 мм помещают строго горизонтально на предметный столик. Охлажденный до температуры $(45 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ агаровый гель наносят на стеклянную пластину в количестве 18,0-20,0 мл. После застывания при комнатной температуре через 20-30 мин на пластине образуется агаровый слой толщиной 2,0 – 2,5 мм.

После застывания геля в нем по специальному трафарету вырезают 6-7 лунок диаметром 1-2 мм. Лунки заполняют испытуемым образцом в объеме, не превышающем объем лунки (по 2 лунки на каждый испытуемый образец). При этом в верхнюю и нижнюю лунки стеклянной пластинки с гелем вносят контрольный образец - нормальную сыворотку крови человека («Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» или иной контрольный образец в соответствии с

указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации), окрашенный пиронином Б (или иным красителем, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации).

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл вносят 500 мл веронал-мединалового или боратного буферного раствора, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Полученный раствор (или иной буферный раствор указанный в фармакопейной статье или нормативной документации) наливают в электродные секции камеры прибора для электрофореза.

Пластину с подготовленным гелем помещают в прибор для электрофореза и соединяют с буферным раствором в электродных камерах прибора с помощью нескольких слоев фильтровальной бумаги. В случае конструкции прибора для электрофореза, предусматривающей соединение агара на пластине с электродным буфером с помощью агаровых столбиков, пластину устанавливают в уравновешенный прибор и заливают расплавленным агаром до его соединения с агаровыми столбиками и образования слоя геля толщиной 1 – 2 мм.

Прибор для электрофореза накрывают крышкой и включают источник питания (напряжение 70-200 В, сила тока 10-40 мА). Электрофорез проводят в течение 1,5-3 ч до момента, когда пятно пиронина Б, соответствующее миграции альбумина, будет находиться на расстоянии 20-25 мм от лунки.

После проведения электрофореза с помощью специального трафарета между лунками в агаровом геле вырезают продольные «канавки» (параллельные направлению миграции). В «канавки» вносят по 0,25 мл преципитирующей антисыворотки: против сывороточных белков крови человека (при проведении испытаний фракционного состава) или поливалентную сыворотку против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи (для подтверждения подлинности).

Пластину с агаровым гелем помещают во влажную камеру и выдерживают при температуре $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ в течение 24 - 48 ч.

Для отмывания белков, не вступивших в реакцию преципитации, пластину с агаром помещают в кюветы, заливают 0,9% раствором натрия хлорида и выдерживают в течение 16-18 ч. Раствор меняют 3-4 раза. Затем пластину извлекают из 0,9% раствора натрия хлорида, накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в 0,9% растворе натрия хлорида и высушивают на воздухе до превращения агарового геля в тонкую пленку. После этого пластину с высушенным гелем накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в 0,9% растворе натрия хлорида, не оставляя пузырьков воздуха, и высушивают при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре не выше 40°C . После высушивания пластинки фильтровальную бумагу смачивают водой и аккуратно удаляют.

Для окрашивания белков используют краситель амидочерный 10Б или другой пригодный краситель (в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации), помещая пластину в кювету с красящим раствором на 30-40 мин. Затем пластину промывают в растворе для отмывки агара (2% раствор уксусной кислоты или иной раствор, в соответствии с указаниями в нормативной документации) в течение 15-40 мин до полного отсутствия окрашенного фона и снова высушивают при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре не выше 40°C .

Липопротеиды окрашивают суданом черным В. Для окрашивания полностью высушенные пластины помещают на 3 ч в красящий раствор, затем обесцвечивают 50% этанолом до полного просветления фона. Липопротеиды окрашиваются в темно-синий цвет. Следует проводить окрашивание полностью высушенного препарата, так как судан черный В нерастворим в воде и окрашивает влажный гель.

Учет результатов при исследовании фракционного состава препаратов иммуноглобулинов человека проводят визуально путем сравнения

электрофореграммы испытуемого образца с электрофореграммой контрольного образца – нормальной сыворотки крови человека («Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» или иной контрольный образец в соответствии с указаниями в нормативной документации), которая должна проявлять регламентированное количество линий преципитации с сывороткой против сывороточных белков крови человека (не менее 15 линий преципитации при использовании «Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза»). Основным компонентом препарата иммуноглобулинов человека должен соответствовать иммуноглобулин G (Ig G) нормальной сыворотки крови человека.

Учет результатов при проведении исследований по подтверждению подлинности препаратов крови человека проводят визуально путем выявления линий преципитации с сывороткой против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи. Должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Примечания

1. Приготовление 0,05М веронал-медианалового буферного раствора (рН 8,6±0,1). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,38 г веронала, 8,76 г медианала, добавляют воды очищенной до метки и перемешивают до полного растворения.

2. Приготовление 0,05М боратного буферного раствора (рН 8,6±0,1). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 6,7 г борной кислоты, 13,4 г натрия тетраборнокислого 10-водного, добавляют воды очищенной до метки и перемешивают.

3. Приготовление 1,25% агарового геля. Приготовление агарового геля осуществляют одним из следующих способов:

а) Для приготовления 1,25% агарового геля используют 0,05М веронал-медианаловый буфер (рН 8,6±0,1) с удвоенной концентрацией солей

(соответственно, 2,76 г веронала и 17,52 г медунала на 1000 мл воды очищенной).

б) Для приготовления 1,25% агарового геля используют боратный буферный раствор (рН $8,6 \pm 0,1$) с удвоенной концентрацией солей (соответственно: 13,4 г борной кислоты и 26,8 г натрия тетраборнокислого 10-водного на 1000 мл воды очищенной).

В химический стакан вместимостью 1000 мл вносят 12,5 г агара, добавляют 500 мл воды очищенной и оставляют для набухания геля в течение часа при температуре $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Стакан с содержимым помещают в кипящую водяную баню и выдерживают до полного расплавления агара. Объем раствора геля доводят водой до 500 мл, затем добавляют равный объем веронал-медуналового или боратного буферного раствора (или иного буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или в нормативной документации). Раствор агара фильтруют через 2-3 слоя марли, прибавляют тиомерсал до концентрации 100 мкг/мл и разливают во флаконы по 40-50 мл (количество, необходимое на две пластинки). Расплавленный агар должен быть прозрачным.

4. Приготовление красящего раствора амидочерного 10Б. Приготовление раствора красителя осуществляют одним из следующих способов:

а) В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,0 г амидочерного 10Б, 450 мл 0,1М раствора уксусной кислоты, 550 мл 0,1М раствора натрия ацетата и перемешивают.

б) В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,0 г амидочерного 10Б, 100 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем до метки водой очищенной и перемешивают. Через 12 ч фильтруют через бумажный фильтр.

5. Приготовление красящего раствора судан черный В. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,2 г судана черного В, 20 мл 1М раствора натрия гидроксида, 380 мл воды очищенной и доводят объем раствора этанолом абсолютным до метки и перемешивают. Смесь непродолжительное время кипятят, охлаждают до комнатной температуры и после остывания краситель переливают в темную склянку с притертой пробкой. Реактив хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

6. Приготовление 2% раствора уксусной кислоты для отмывки агара. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 20,0 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Реактив хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

**Определение активности факторов
свертывания крови**

**ОФС.1.8.2.0003.15
Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности факторов системы свертывания крови человека I, II, VII, VIII, IX, X, XI, фактора Виллебранда, антитромбина III в плазме и препаратах крови.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Определение активности факторов свертывания базируется на 2 подходах:

1. Одностадийный метод. Восстановление процесса свертывания крови в дефицитной по фактору плазме после добавления препарата этого фактора (клоттинговый метод).
2. Двухстадийный метод. На первой стадии с использованием специфического кофактора активируется протеолитическая активность фактора II или фактора X с образованием соответственно активированного фактора IIa или Xa. На второй стадии количество образовавшегося активированного фактора определяют по реакции расщепления им специфического хромогенного пептида (хромогенный метод).

Возможно проведение хромогенного метода 2 способами: по кинетике образования хромогена под действием активированного фактора или по конечной точке накопления хромогена за определенное время инкубации.

Для проведения обоих методов возможно использование пластиковых пробирок, планшетов, оптико-механических, механических

полуавтоматических и полностью автоматизированных коагулометров.

Во всех методах расчет активности производят при сравнении активности тестируемого образца с активностью Международного стандарта NIBSC или вторичного стандартного образца фактора свертывания, откалиброванного относительно международного стандарта в международных единицах активности (МЕ). Эквивалентность международного стандарта в МЕ устанавливается ВОЗ. За 1 МЕ (100%) принимают активность фактора свертывания в 1,0 мл свежей нормальной пулированной плазме крови от 300 доноров. Активность может быть выражена в МЕ/мл, МЕ/флакон, МЕ/мг белка и в % от заявленного производителем количества.

ФАКТОРЫ

Фактор I (фибриноген)

Клоттинговый метод

Определение активности фибриногена проводят методом Клаусса.

Принцип метода

При добавлении тромбина к образцу, содержащему фибриноген, наблюдается образование сгустка фибрина. При использовании тромбина с высокой активностью (~10 МЕ/мл) и образцов с низкой концентрацией фибриногена (ниже 100 мг/дцл) можно получить линейную зависимость.

Для определения фибриногена используют коммерческие тестовые системы, в состав которых входит реагент тромбина, содержащий ингибитор гепарина, и буфер для разведения образцов или коммерческий тромбин-реагент.

Концентрация фибриногена выражается в мг/дцл. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец фибриногена или аттестованную по международному стандарту плазму-калибратор. Стандартный образец или образец плазмы-калибратора растворяют в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 5 последовательных разведений стандартного образца, начиная с концентрации ~ 100 мг/дцл, с

помощью буфера для разведения образцов $pH = 7,3 \pm 0,1$. Анализ проводят при температуре $37^{\circ}C$ согласно инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют время образования сгустка. По полученным результатам в логарифмических координатах строят калибровочный график зависимости времени образования сгустка от концентрации фибриногена.

Готовят 2 разведения испытуемого образца с концентрацией ниже 100 мг/дцл. Для каждого разведения время образования сгустка определяют трижды. Количество фибриногена в каждом разведении определяют по калибровочному графику.

Фактор II (тромбин)

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора II проводят с использованием в качестве субстрата человеческой плазмы, дефицитной по фактору II. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер $pH\ 7,3 \pm 0,1$ с добавлением 0,1% бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора II в интервале активности от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}C$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору II, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^{\circ}C$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно нагретого до температуры $(37 \pm 0,5)^{\circ}C$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах.

По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора II, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора II для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность ФП (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;
 k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Метод основан на сравнении ферментативной активности фактора IIa, образованного после специфической активации фактора II, в отношении специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью стандартного образца (международного или аналогичного).

Фактор II активируется с помощью активатора экарина, выделенного из яда гадюки. Активированный фактор II (тромбин) селективно расщепляет хромогенный субстрат (Н-D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонилглицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид, Н-D-циклогексилглицил- α -аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат) с образованием *p*-нитроанилина. Кинетику реакции исследуют фотометрическим методом при 405 нм. При этом значение оптической плотности пропорционально активности фактора II.

Определение фактора II хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору II, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буферным раствором pH 8,4. Каждое разведение стандартного

образца определяют двухкратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием микропланшет и спектрофотометра, поддерживающего температуру в диапазоне $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 25 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца. В каждую лунку прибавляют по 125 мкл буфера для разведения, по 25 мкл экарина и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 мин. По истечении времени инкубации в каждую лунку вносят по 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIa.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$).

Если непрерывное измерение оптической плотности невозможно, определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные интервалы времени (например, через 40 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают $\Delta A/\text{мин}$ как угол наклона прямой. Из значений $\Delta A/\text{мин}$ каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

3. Тест на отсутствие тромбина

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный в соответствии с инструкцией раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина.

Приготовление раствора фибриногена

0,3 г фибриногена растворяют в 100 мл, перемешивают и выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре.

Срок хранения раствора 1 мес при температуре от 2 до 8°C.

Приготовление раствора тромбина

Леофилизат растворяют в соответствии с инструкцией производителя, выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре и разводят 0,9% раствором натрия хлорида до содержания тромбина 1 МЕ/мл.

Срок хранения раствора 6 мес при температуре минус 20°C. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

Ход определения

В 2 пробирки вносят равные объемы восстановленного препарата и раствора фибриногена. В третью пробирку (контрольная проба) вносят равные объемы раствора тромбина и раствора фибриногена, перемешивают содержимое пробирок вращательными движениями. Одну пробирку с восстановленным препаратом инкубируют на водяной бане с температурой 37°C в течение 6 ч, другую пробирку с восстановленным препаратом – при комнатной температуре в течение 24 ч. Отмечают наличие или отсутствие коагуляции (сгустка).

Контрольную пробу инкубируют на водяной бане при температуре 37°C и отмечают время образования сгустка.

Критерием приемлемости результатов является коагуляция в контрольной пробе через 30 с.

Фактор VII

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора VII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VII. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер pH 7,3 с добавлением 0,1% раствора альбумина человеческого или бычьего. Для построения калибровочного графика готовят

серию последовательных разведений стандарта образца фактора VII в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору VII и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVII (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;
 k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

В присутствии тканевого фактора (TF) и ионов Ca^{2+} происходит активация фактора VII (образование FVIIa). Комплекс FVIIa, TF, Ca^{2+} и фосфолипида активирует фактор X. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-*n*-нитроанилид-ацетат с образованием *n*-нитроанилина. Исследование образца проводят фотометрическим методом

при 405 нм. Значение оптической плотности (или увеличение поглощения) пропорционально количеству фактора VII.

Определение фактора VII хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору VII, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буфером pH 7,3 – 8,0 с добавлением 0,1% человеческого или бычьего альбумина. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

В лунки микропланшет вносят разведения испытуемого препарата или стандартного образца, добавляют кальций-тромбопластиновую смесь, раствор фактора X и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ от 2 до 5 мин, после чего вносят раствор хромогенного субстрата фактора Xa.

Измеряют изменение оптической плотности при длине волны 405 нм либо в кинетическом режиме, либо прерывают реакцию гидролиза через 3 – 15 мин добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной и измеряют оптическую плотность.

Фактор VIII

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора VIII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VIII. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор pH (7,3±0,1), с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта, начиная от концентрации 2 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации ~ 0,5 – 2 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре (37±0,5)°C. В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору VIII, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют при температуре (37±0,5)°C в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры (37 ± 0,5)°C 0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VIII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VIII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVIII (*A*) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого препарата, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Количественное определение фактора VIII проводят с помощью набора реактивов, в котором фактор VIII является кофактором для фактора IXa при активации фактора X в форму Xa, расщепляющего хромогенный субстрат.

Принцип метода

В присутствии ионов Ca^{2+} и фосфолипидов фактор X под действием фактора IXa активируется в Ха. При избытке фактора X и оптимальных количеств Ca^{2+} , фосфолипидов и фактора IXa скорость активации фактора X линейно зависит от количества фактора VIII. Фактор Ха гидролизует хромогенный субстрат S-2765 (N-a-Z-DArg-Gly-Arg-pNA) с высвобождением хромогенной группы pNA, окраску которой регистрируют спектрофотометрически при 405 нм. Количество образовавшегося фактора Ха и, следовательно, интенсивность окрашивания, пропорциональны активности фактора VIII в образце.

Набор реактивов для определения активности фактора VIII стабилен в течение срока, указанного производителем при температуре хранения от 2 до 8°C.

Набор реактивов содержит:

1. 7,7 мг хромогена S-2765 с добавкой синтетического ингибитора тромбина I-2581. Реактив восстанавливают в 6,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
2. Реактив бычьих факторов: 0,3 Ед фактора IX, 2,7 МЕ фактора X и 1 NIH Ед тромбина, лиофилизированных в присутствии 40 ммоль CaCl_2 и 0,2 ммоль фосфолипидов. Реактив восстанавливают в 2,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 12 ч при температуре от 2 до 8°C, 2 нед при температуре минус 30 °C и 1 мес при температуре минус 80°C. Не следует хранить при температуре минус 20°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
3. Концентрат $\times 10$ трис-буфера. Стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед употреблением разводят стерильной водой для инъекций в соотношении 1:10.

Дополнительные реактивы:

1. Международный стандартный образец – раствор концентрата фактора свертывания VIII человека (NIBSC, Eur.Pharm.Ref.Std. BRP Н 0920000) или плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.
2. Контрольная нормальная или патологическая плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.
3. 0,9% раствор натрия хлорида.
4. 20% уксусная кислота или 2% лимонная кислота (используются в методике конечной точки накопления хромогена).
5. Вода лабораторная деионизованная MillyQ.

Оборудование:

1. Пластиковые пробирки;
2. Микропланшеты;
3. Термостат 37°C;
4. Спектрофотометр 405 нм или ридер микропланшет 405 нм;
5. Калиброванные пипетки;
6. Вортекс;
7. Секундомер.

Исследуемый образец перед определением разводят до ожидаемой активности 1 МЕ/мл.

Определение можно проводить в кинетическом режиме и по конечной точке, в пробирках (макрометод) и в микропланшетах (микрометод).

Калибровка

При проведении каждого определения проводят построение калибровочной кривой. Разведение стандартного образца готовят в 2 этапа: предварительное разведение до активности 1 – 2 МЕ/мл и конечные разведения для построения калибровочной зависимости в диапазоне 0 – 2 МЕ/мл. После разведения определение следует провести в течение 30 мин.

Ход определения

Определение в пробирках

200 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца вносят в пробирки, инкубируют в течение 3-4 мин при температуре 37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

Определение в микропланшетах

В лунки микропланшета вносят по 50 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца, инкубируют в течение 3-4 мин при 37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

Кинетический метод определения

После прибавления раствора хромогена в течение 2 – 10 мин измеряют изменение оптической плотности раствора при 405 нм.

Определение по конечной точке

После прибавления раствора хромогена смесь продолжают инкубировать при температуре 37°C в течение 2 – 10 мин, после чего для остановки реакции прибавляют 50 мкл 20% уксусной или 2% лимонной кислоты. Измеряют оптическую плотность раствора против буфера при 405 нм.

Расчеты

Строят зависимость изменения оптической плотности в минуту (для кинетического метода) или оптической плотности (для определения по конечной точке) разведений стандартного раствора от концентрации в них фактора VIII. Активность в исследуемом образце определяют по калибровочной кривой с учетом предварительного разведения образца.

Фактор IX

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора IX проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору IX. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный pH 7,3 с добавлением 0,1% раствора бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору IX, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора IX, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора IX для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FIX (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца,

найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

Фактор X

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора X проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору X. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор pH 7,3 с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора X в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору X, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора X , по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора X для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность фактора X (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Фактор X активируют с помощью полученного из змеиного яда FX-активатора. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 N- α -бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида ацетат с образованием *p*-нитроанилина. Образцы исследуют фотометрическим методом при 405 нм. Количество фактора X пропорционально увеличению оптической плотности раствора.

Определение фактора X хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору X, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца (в соответствии с инструкцией) и 3 разведения препарата. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 12,5 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца, в каждую лунку прибавляют по 25 мкл специфического активатора фактора X из яда гадюки Рассела и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 90 с, после чего в каждую лунку вносят по 150 мкл рабочего разведения хромогенного субстрата фактора X.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) или измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные интервалы времени (например, через 30 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают $\Delta A/\text{мин}$ как угол наклона прямой. Из значений $\Delta A/\text{мин}$ каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

Фактор Виллебранда

Определение активности фактора Виллебранда проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом.

Активность фактора Виллебранда определяется путем сравнения его активности с активностью стандартного образца.

Метод агглютинации

Метод основан на определении коферментной активности фактора Виллебранда при агглютинации суспензии тромбоцитов в присутствии ристоцетина А.

Испытание может проводиться количественными методами с использованием автоматизированного оборудования или полуколичественным методом путем визуальной оценки агглютинации в серии разведений.

Полуколичественный метод

Из стандартного образца и восстановленного раствора препарата готовят последовательные разведения в 0,9% растворе натрия хлорида с 1–5% раствором альбумина человека до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл. По 0,05 мл каждого разведения стандартного образца и исследуемого препарата наносят на предметное стекло, добавляют по 0,1 мл суспензии тромбоцитов с ристоцетином и перемешивают в течение 1 мин. В качестве отрицательного контроля

используют раствор разведения. После 1 мин инкубации при комнатной температуре визуально оценивают агглютинацию тромбоцитов. Максимальное разведение, при котором происходит агглютинация тромбоцитов, является титром ристоцетиновой коферментной активности образца.

Количественный метод

Готовят не менее 2 серий последовательных разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл.

Определение проводят в соответствии с инструкцией производителя автоматизированного оборудования. Получают значения зависимости изменения оптического поглощения (степени мутности раствора) от активности фактора Виллебранда.

Определение содержания фактора Виллебранда в испытуемом препарате осуществляют с использованием коэффициентов линейного уравнения зависимости оптической плотности раствора от содержания фактора Виллебранда в стандартном образце.

Иммуноферментный метод

Метод основан на определении коллаген-связывающей активности фактора Виллебранда. При специфическом связывании фактора Виллебранда с фибриллами коллагена и последующем связывании поликлональных антител к фактору Виллебранда, конъюгированных с ферментом, после добавления хромогенного субстрата образуется хромофор, который может быть количественно определен спектрофотометрическим методом. Существует линейная зависимость между связыванием коллагена с фактором Виллебранда и оптической плотностью.

Определение проводят с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России в соответствии с инструкциями по применению.

Для испытаний готовят не менее 3 последовательных серий разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 1,0 МЕ/мл. Далее проводят испытания в соответствии с инструкцией производителя используемой тест-системы.

Активированные факторы свертывания крови

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина. Готовят разведения препарата 1:10 и 1:100 с помощью трис-буферного раствора pH 7,5.

В 3 пробирки вносят по 0,1 мл стандартной плазмы человека и по 0,1 мл раствора фосфолипидов, помещают в водяную баню с температурой $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 60 с, после чего в первую пробирку добавляют 0,1 мл трис-буферного раствора (контрольная проба), во вторую – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:10, в третью пробирку – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:100. Далее к содержимому каждой пробирки немедленно добавляют по 0,1 мл нагретого до температуры 37°C раствора кальция хлорида 3,7 г/л. Отмечают время формирования сгустка от момента добавления раствора кальция хлорида.

Критерием приемлемости результатов является время коагуляции в контрольной пробе в интервале от 200 до 350 с.

Специфическая удельная активность

Специфическую активность факторов свертывания рассчитывают по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{Активность фактора свертывания крови, МЕ/мл}}{\text{Содержание белка, мг/мл}}$$

Определение активности антитромбина III

Хромогенный метод

Метод определения активности АТШ основан на его способности нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. К образцу, содержащему АТШ, добавляют избыточные количества гепарина и тромбина. Образующийся комплекс АТШ-гепарин нейтрализует количество тромбина, пропорциональное количеству АТШ. Оставшийся тромбин селективно расщепляет хромогенный субстрат с образованием *n*-нитроанилина, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, количество АТШ обратно пропорционально величине поглощения свободного *n*-нитроанилина в образце.

Определение активности АТШ проводят с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец АТШ или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Зависимость величины оптической плотности от активности АТШ линейна в интервале активности АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Используя буфер с гепарином, готовят 4 разведения стандартного образца или плазмы-калибратора с активностью АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Анализ проводят при температуре 37°C согласно схеме, приведенной в инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют величину оптической плотности при 405 нм и в линейных координатах строят калибровочный график зависимости абсорбции от активности АТШ.

Готовят 2 разведения исследуемого образца с ориентировочной активностью АТШ менее 1,0 МЕ/мл. Определение активности АТШ в испытуемых образцах проводят при температуре 37°C согласно указаниям в инструкции к набору. Активность АТШ в испытуемых разведениях находят по калибровочному графику. Активность АТШ в исследуемом образце определяют как:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность АТШ в соответствующем разведении;
 k – разведение образца.

Количественное определение гепарина

1. Клоттинговый метод

Метод основан на способности гепарина за счет ингибирования ряда факторов удлинять время свертывания нормальной плазмы.

Для проведения анализа используют нормальную человеческую плазму, стандартный образец гепарина, АЧТВ-реагент и раствор хлористого кальция 0,025М. В качестве разбавителя стандартного и испытуемых образцов используют 0,9% раствор натрия хлорида. Стандартный образец гепарина растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Готовят 3 разведения стандартного образца с активностью гепарина 0,3, 0,4 и 0,5 МЕ/мл. Образцы стандарта с данными активностями должны удлинять время свертывания нормальной плазмы минимум в 1,5 раза, в противном случае следует использовать разведения с большей активностью гепарина. Параллельно готовят 3 разведения исследуемого образца таким образом, чтобы ориентировочно активность гепарина в данных разведениях попадала в интервал активности гепарина в разведениях стандартного образца.

Анализ проводят с помощью автоматического или полуавтоматического коагулометра в пластиковых пробирках при температуре 37°C. В пробирку вносят 100 мкл нормальной человеческой плазмы, 100 мкл разведения стандартного или исследуемого образца или 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида (холостой опыт), добавляют по 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют смесь в течение 120 – 240 с при температуре (37±0,1)°C. Затем в пробирку вносят 100 мкл предварительно прогретого до температуры 37°C 0,025М раствора кальция хлорида и фиксируют время свертывания образца. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут быть изменены с соблюдением пропорции. Время свертывания нормальной плазмы (холостой опыт) должно составлять 25 – 40

с. Для каждого разведения стандартного и исследуемого образцов время свертывания определяют трижды.

2. Хромогенный метод

Метод основан на расщеплении хромогенного субстрата, специфического для активированного фактора X (FXa). При внесении в образец, содержащий гепарин, избыточных количеств АТШ и FXa происходит ингибирование количества FXa, пропорционального количеству гепарина. Оставшийся FXa отщепляет от специфического хромогенного субстрата *n*-нитроанилин, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, величина абсорбции обратно пропорциональна количеству гепарина. Данным методом определяют содержание как нефракционированного, так и низкомолекулярного гепарина в анти-Ха единицах.

Количество гепарина хромогенным методом определяют с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец гепарина или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор разводят в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 4 разведения стандартного образца с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл, используя буфер для разведения pH 8,4. Анализ проводят при температуре 37°C в соответствии с инструкцией к набору. Для каждого разведения трижды определяют абсорбцию при 405 нм, после чего в линейных координатах строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации гепарина. Зависимость линейна в диапазоне концентраций гепарина 0 – 1,0 анти-Ха ед/мл.

Для исследуемого образца готовят 2 разведения с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл. Анализ проводят согласно инструкции к набору при температуре 37°C. Для каждого разведения величину абсорбции определяют трижды.

Определение проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок, микропланшет или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 20 мкл стандартной плазмы человека и 20 мкл раствора антитромбина III. Далее в эти лунки вносят соответственно по 20 , 60 , 100 и 140 мкл испытуемого или стандартного препарата и доводят объем раствора в каждой лунке до 200 мкл буфером (активность гепарина в конечной реакционной смеси 0,02 - 0,08 МЕ/мл).

По 40 мкл из каждой лунки планшета переносят во вторую серию лунок, в которые добавляют по 20 мкл раствора бычьего фактора Ха и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с, после чего в лунки добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха и вновь инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 3 – 15 мин, измеряя скорость расщепления субстрата путем постоянного измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (кинетический режим) или после остановки реакции добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной (конечная точка определения).

Содержание гепарина в испытуемом разведении определяют по калибровочному графику с учетом разведения.

При проведении исследований в автоматическом режиме с использованием коагулометра получают значения зависимости изменения оптической плотности от концентрации гепарина.

**Испытание на анти-D антитела в
лекарственных препаратах
иммуноглобулинов
человека**

ОФС.1.8.2.0004.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. Анти-D антитела определяют методом гемагглютинации «на плоскости» (Метод А) или в геле (Метод В).

Принцип метода состоит в том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-D антитела, являясь иммуноглобулинами класса G, способны вызывать агглютинацию D-положительных эритроцитов.

Проведение испытания

Содержание анти-D антител определяют с использованием папаинизированных D-положительных эритроцитов человека группы крови I (0). Предпочтительно использование эритроцитов фенотипа $0R_2R_2$, возможно также применение эритроцитов фенотипов $0R_1R_1$ или $0R_1R_2$. Смешивание эритроцитов разных фенотипов недопустимо.

Для контроля специфичности анализа применяют D-отрицательные эритроциты фенотипа $0гг$.

Допустимо применение как свежеприготовленной суспензии эритроцитов (при испытаниях методом гемагглютинации «на плоскости», Метод А), так и стандартных эритроцитов, входящих в тест-наборы (Методы А и В). При определении содержания анти-D-антител Методом А используют

3% суспензию эритроцитов, при определении содержания гемагглютининов гелевым методом (Метод В) используют 0,8% суспензию эритроцитов.

Метод гемагглютинации «на плоскости» (Метод А)

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равное количество соответствующего разведения препарата и 3% суспензии D-положительных эритроцитов человека группы крови I (0) – первый ряд и 3% суспензии D-отрицательных эритроцитов человека группы крови I (0) – второй ряд. К подготовленному разведению стандартного образца также добавляют равное количество 3% суспензии D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) и 3% суспензии D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд). Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 10 сек, затем центрифугируют в течение 1 мин при 80 об/мин. Пробирки (планшеты) располагают под углом 70° к горизонтальной поверхности и оценивают визуальную агглютинацию эритроцитов через 4 – 5 мин (но не более чем через 10 мин).

Содержание анти-D антител, определяемое максимальным разведением препарата, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, сравнивают с содержанием анти-D антител в положительном стандартном образце.

Метод гемагглютинации в геле (Метод В)

Гелевый метод основан на использовании гелевой карты, представляющей собой пластиковый планшет с микропробирками, наполненными гелевыми колонками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, содержащей полимеризованные микросферы декстрана в буферном растворе низкой ионной силы (LISS).

В дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8 % суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) или по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд) и по

25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца. Одновременно готовят пробы положительного и отрицательного стандартных образцов содержания анти-D антител: в дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) или по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения стандартного образца. Пробы инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют (на специальной центрифуге для гелевых карт) в стандартных условиях (запрограммированный режим) и оценивают агглютинацию. Агглютинированные эритроциты распределяются в толще гелевой колонки или в ее верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки.

Содержание анти-D антител, определяемое максимальным разведением препарата, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, сравнивают с содержанием анти-D антител в положительном стандартном образце.

Критерии приемлемости результатов:

– в пробирках (планшетах, микропробирках), содержащих суспензию D-отрицательных эритроцитов человека, агглютинация должна отсутствовать. Наличие агглютинации в этих пробирках (планшетах, микропробирках) свидетельствует о неспецифической реакции; испытания в этом случае необходимо повторить;

– содержание анти-D антител в положительном стандартном образце должно соответствовать аттестованным величинам.

Примечания

1. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец разводят фосфатным буферным раствором ($\text{pH } 7,4 \pm 0,1$), содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка в образце 25 г/л. Это

разведение испытуемого образца принимают за двукратное разведение (1:2), даже если оно и не соответствует истинной кратности разведения.

Готовят два ряда двукратных разведений испытуемого образца с использованием фосфатного буферного раствора ($\text{pH } 7,4 \pm 0,1$), содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256). При использовании гелевого метода (Метод В) разведения испытуемого образца готовят с использованием 0,9% раствора натрия хлорида или буферного раствора низкой ионной силы (LISS).

2. Подготовка стандартных образцов содержания анти-D антител. В качестве стандартных образцов используют 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий 0,0475 МЕ/мл анти-D антител и имеющий номинальный титр в реакции гемагглютинации 1:8 (положительный стандартный образец) и 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий анти-D антитела в разведении не более 1:2 (отрицательный стандартный образец). Содержание анти-D антител в положительном стандартном образце является максимально допустимым для препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Подготовка стандартных образцов проводят в соответствии с инструкцией по применению. Анализ проводят с образцами, разведенными фосфатным буферным раствором ($\text{pH } 7,4 \pm 0,1$), содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка 25 г/л.

3. Подготовка раствора папаина. Лиофилизат папаина растворяют в соответствии с инструкцией производителя. Инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 10–15 мин. Раствор используют свежеприготовленным. Возможно хранение раствора при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 5 сут или при температуре минус $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 6 мес. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

4. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Свежеприготовленные D-положительные эритроциты (хранившиеся не более 3 сут), полученные не менее чем от 3 доноров, центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугируют 10 мин при тех же условиях. Процедуру повторяют не менее 3 раз, до получения прозрачной надосадочной жидкости.

В стеклянную пробирку вносят равные объемы промытых эритроцитов и раствора папаина, инкубируют в течение 15 мин при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а затем центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугируют при тех же условиях.

Для приготовления 3% суспензии 1 объем осадка папаинизированных эритроцитов ресуспендируют в 32 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина.

Аналогичным образом приготавливают 3% суспензию D-отрицательных эритроцитов, полученных от 1–3 доноров.

5. Приготовление фосфатного буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 8,0 г натрия хлорида, 0,76 г безводного натрия гидрофосфата, 0,2 г калия хлорида, 0,2 калия дигидрофосфата. Добавляют 900 мл воды очищенной. Доводят pH до $7,4 \pm 0,1$ 1М раствором натрия гидроксида или 1 М раствором хлористоводородной кислоты, перемешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Определение анти-А и анти-В
гемагглютининов в лекарственных
препаратах иммуноглобулинов
человека**

ОФС.1.8.2.0005.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, используемый для определения анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Метод непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А) или гелевый метод (Метод В) основаны на том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-А и анти-В гемагглютинины, являясь неполными антителами класса Ig G, вызывают сенсibilизацию эритроцитов. Добавление антиглобулиновой сыворотки в солевой среде при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ вызывает агглютинацию сенсibilизированных эритроцитов и позволяет визуализировать результат реакции.

Проведение испытания

Содержание гемагглютининов определяют с использованием эритроцитов человека групп крови A₁ (II), резус-отрицательный и В (III), резус-отрицательный. Допустимо применение как свежеприготовленной суспензии (при использовании метода непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А), так и стандартных эритроцитов, входящих в наборы для определения групп крови (при использовании Методов А и В).

При определении содержания гемагглютининов «на плоскости» (Метод А) используют 5% суспензию эритроцитов, при определении содержания

гемагглютининов гелевым методом (Метод В) использую 0,8% суспензию эритроцитов.

Метод непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А)

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равное количество соответствующего разведения испытуемого образца (ИО) и 5% суспензии эритроцитов человека группы крови А₁ (II) (первый ряд) и 5% суспензии эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд). Пробы осторожно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. По окончании инкубации пробы центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Затем удаляют надосадочную жидкость, полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме 0,9% раствора натрия хлорида и вновь центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Процедуру повторяют не менее 3 раз. Надосадочную жидкость удаляют, добавляют равный осадку эритроцитов объем поливалентной антиглобулиновой сыворотки (сыворотка Кумбса) и осторожно перемешивают. Пробы инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. По окончании инкубации под микроскопом или визуально исследуют пробы, отмечая наличие агглютинации эритроцитов.

Титр гемагглютининов определяют как максимальное разведение испытуемого образца, при котором происходит агглютинация эритроцитов любой степени интенсивности. Разведение до содержания белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

В каждую пробу, в которой не определяется агглютинация, вносят равное количество (по объему) контрольных клеток Кумбса, осторожно перемешивают и через 2–4 мин оценивают агглютинацию.

Критерии приемлемости результатов:

– в пробах с отрицательным результатом (отсутствие агглютинации) после добавления контрольных клеток Кумбса должна наблюдаться агглютинация.

Гелевый метод (Метод В)

Гелевый метод основан на использовании гелевой карты, представляющей собой пластиковый планшет с микропробирками, наполненными гелевыми колонками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, содержащей полимеризованные микросферы декстрана в буферном растворе низкой ионной силы (LISS), смешанном с поливалентной антиглобулиновой сывороткой (сыворотка Кумбса).

В дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8% суспензии стандартных эритроцитов человека группы крови A₁ (II) (первый ряд) и 0,8% суспензии эритроцитов человека группы крови B (III) (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца (ИО). Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°C в течение 15 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют на специальной центрифуге (для гелевых карт) в стандартных условиях (запрограммированный режим) и оценивают агглютинацию.

Титр гемагглютининов определяют как максимальное разведение испытуемого образца, при котором наблюдают распределение агглютинированных эритроцитов в толще гелевой колонки или в её верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки. Разведение до содержания белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

Примечания

1. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый препарат разводят солевым раствором (0,9% раствор натрия хлорида или буферный раствор низкой ионной силы (LISS)) до содержания белка 30 г/л.

Готовят два ряда двукратных разведений испытуемого образца с использованием 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128). При использовании гелевого метода (Метод В) разведения препарата готовят с использованием 0,9% раствора натрия хлорида или буферного раствора низкой ионной силы (LISS).

2. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Эритроциты человека группы крови A₁ (II), резус-отрицательные (свежеприготовленные, не более 3 сут хранения) центрифугируют 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость сливают. Полученный

осадок ресуспендируют в десятикратном объеме 0,9% раствора натрия хлорида и снова центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяют не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. Для получения 5% суспензии 1 объем осадка эритроцитов ресуспендируют в 19 объемах 0,9% раствора натрия хлорида.

Аналогичным образом приготавливают 5% суспензию эритроцитов человека группы крови В (III), резус-отрицательные.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Определение молекулярных
параметров иммуноглобулинов
методом ВЭЖХ**

ОФС.1.8.2.0006.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), предназначенный для определения молекулярных параметров иммуноглобулинов. Механизм процесса эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии заключается в хроматографическом распределении молекул иммуноглобулинов в соответствии с их размером и молекулярными массами. Основные положения эксклюзионной ВЭЖХ указаны в ОФС «ВЭЖХ».

Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии вводится взамен метода гель-фильтрации.

Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Процесс эксклюзионной ВЭЖХ происходит в водной среде и называется гель-фильтрационным, в результате чего происходит распределение молекул иммуноглобулинов по их размеру в широком диапазоне молекулярных масс от 10 до 600 кДа. Особенностью метода эксклюзионной жидкостной ВЭЖХ является использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (размером 3-5 мкм). Это позволяет быстро и полно разделять сложные смеси веществ.

Принципиальные основы метода заключаются в объеме эксклюзионной колонки, который можно выразить суммой трех слагаемых:

$$V_c = V_o + V_i + V_d,$$

где: V_o – свободный объем подвижной фазы;

V_i – объем пор, заполненный подвижной фазой (объем неподвижной фазы);

V_d – объем матрицы сорбента без учета пор.

Полный объем подвижной фазы колонки (V_t) представляет собой сумму свободного объема подвижной фазы (V_o) и объема неподвижной фазы V_i .

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит в основном от соотношения размеров молекул и пор. Коэффициент распределения K_d представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной (C_1) и подвижной фазах (C_o): $K_d = C_1/C_o$. Время удерживания молекул иммуноглобулинов зависит от силы взаимодействия вещества с подвижной и неподвижной фазами.

Анализ иммуноглобулинов проводят в соответствии с методиками, изложенными в фармакопейных статьях или нормативной документации, с указанием следующих необходимых параметров: пробоподготовки исследуемого образца; приготовления стандартных образцов; приготовления подвижной фазы. При описании требуемых хроматографических условий необходимо указать:

- характеристику хроматографической колонки (ее марку (тип), размеры);
- диапазон разделения молекулярных масс;
- состав и название подвижной фазы;
- наименование носителя (сорбента);
- характеристику детектора;
- длину волны;
- объем вводимой пробы;
- температуру колонки;

- скорость потока подвижной фазы;
- последовательность (порядок) ввода проб;
- время хроматографирования.

В процессе разделения фракций иммуноглобулинов на хроматографической колонке белковые молекулы иммуноглобулина с молекулярной массой более 40 кДа свободно проходят между гранулами носителя (сорбента), не попадая и не задерживаясь в пористых гранулах. Более мелкие молекулы частично попадают и задерживаются в гранулах и медленнее вымываются из них подвижной фазой. Очень мелкие молекулы с молекулярной массой менее 50 кДа попадают в гранулы носителя и медленно вымываются подвижной фазой. Распределение по времени удерживания/выхода компонентов (фракций) иммуноглобулинов, о чем указывается в фармакопейных статьях или нормативной документации, происходит в порядке уменьшения их молекулярных масс: полимеры (агрегаты), димеры, мономеры Ig G (основная фракция сывороточного иммуноглобулина) и фрагменты Ig G.

Количественный анализ иммуноглобулинов состоит из следующих стадий: 1) хроматографическое разделение; 2) измерение площади и/или высоты пиков; 3) расчет количественного состава фракций иммуноглобулинов на основании хроматографических данных; 4) интерпретация полученных результатов (статистическая обработка данных).

Содержание компонентов (фракций) иммуноглобулинов вычисляется автоматически с помощью программного обеспечения счетно-аналитического прибора по площадям пиков и указывается в процентах. Процентное содержание определяемых компонентов иммуноглобулинов должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пригодность хроматографической системы оценивается по стандартным образцам. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия, описанные в фармакопейной статье или

нормативной документации: фактор разрешения (R) между пиками, эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику с указанием числа теоретических тарелок, относительное стандартное отклонение площадей пиков.

Примечания

1. Испытуемый раствор. Образцы иммуноглобулина перед анализом разводят, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Подвижная фаза. Подвижную фазу готовят в соответствии с методикой, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

3. Стандартные образцы:

- раствор для проверки пригодности хроматографической системы;
- маркеры для эксклюзионной ВЭЖХ с молекулярной массой в диапазоне от 10000 до 600000 Да. Приготовление маркеров осуществляют в соответствии с инструкцией по применению или как описано в методике, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

**Определение антикомплементарной
активности лекарственных
препаратов иммуноглобулинов
человека для внутривенного введения**

ОФС.1.8.2.0007.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения.

Метод определения антикомплементарной активности (АКА) в препаратах иммуноглобулинов человека основан на способности высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов) связывать комплемент в отсутствие комплексов антиген-антитело и, таким образом, препятствовать лизису сенсibilизированных эритроцитов. Количество высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов), обладающих антикомплементарной активностью, в препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения должно быть минимальным.

Антикомплементарную активность испытуемого препарата иммуноглобулинов (в процентах) выражают как расход комплемента в испытуемом образце по отношению к контрольному комплементу, принятому за 100%. Допустимый предел связывания комплемента – не более 50% (т.е. не более 1 CH_{50} /мг белка).

Методика определения

Для определения антикомплементарной активности иммуноглобулина человека для внутривенного введения берут фиксированное количество испытуемого образца (10 мг иммуноглобулина в объеме 0,2 мл 5% раствора)

и инкубируют с определенным количеством комплемента морских свинок (20 CH₅₀); затем добавляют сенсibilизированные эритроциты барана и определяют количество несвязавшегося комплемента.

Подготовка 5% суспензии эритроцитов барана. Эритроциты барана отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной крови барана в течение 5 мин при 3000 об/мин (1000 g). Осадок эритроцитов промывают не менее трех раз 10-кратным (к объему эритроцитов) объемом буферного раствора до получения бесцветной промывной жидкости. Отбирают определенный объем отмытых эритроцитов и смешивают с рассчитанным количеством буферного раствора для получения 5% суспензии (об/об).

Плотность клеточной суспензии определяют следующим образом: 0,2 мл полученной суспензии эритроцитов прибавляют к 2,8 мл воды очищенной, перемешивают, центрифугируют полученный раствор в течение 5 мин при 3000 об/мин, измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 541 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (раствор сравнения – вода очищенная). Суспензия пригодна для испытания, если измеренная оптическая плотность супернатанта составляет 0,62±0,01.

Корректируют плотность суспензии до указанного показателя добавлением необходимого количества отмытых эритроцитов, если оптическая плотность ниже 0,61, либо рассчитанным по формуле (1) количеством буферного раствора, если оптическая плотность выше 0,63:

$$V_{\text{БР}} = (V_{\text{Н}} \times A / 0,62) - V_{\text{Н}} ,$$

где: $V_{\text{БР}}$ – добавочный объем буферного раствора, мл;

$V_{\text{Н}}$ – начальный объем суспензии, мл;

A – значение оптической плотности исходной суспензии;

0,62 – целевое значение оптической плотности.

Титрование гемолитической сыворотки

Готовят серию разведений гемолитической сыворотки, в соответствии с Таблицей 1 (значения разведений гемолитической сыворотки могут быть изменены).

Таблица 1 - Порядок приготовления разведений гемолитической сыворотки

Разведение гемолитической сыворотки	Используемые растворы		
	Объем буферного раствора, мл	Гемолитическая сыворотка	
		Разведение	Объем, мл
1:50	4,9	Без разведения	0,1
1:100	1,0	1:50	1,0
1:250	4,0	1:50	1,0
1:500	2,0	1:250	2,0
1:1000	2,0	1:500	2,0
1:2000	1,5	1:1000	1,5
1:3000	2,0	1:1000	1,0
1:4000	1,0	1:2000	1,0

Далее из каждой пробирки с полученными разведениями гемолитической сыворотки переносят по 1,0 мл в новые пробирки, добавляют по 1,0 мл 5% суспензии эритроцитов и осторожно перемешивают. Пробы инкубируют при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

По окончании инкубации по 0,2 мл каждой из этих инкубированных проб переносят в новые пробирки и прибавляют по 1,1 мл буферного раствора и по 0,2 мл предварительно приготовленного раствора комплемента (например, разведение 1:150). Испытание выполняют в двух повторностях.

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,4 мл буферного раствора и по 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,4 мл воды очищенной и по 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов.

Пробы инкубируют в термостате при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Определяют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм.

Рассчитывают степень гемолиза в процентах ($Y_{\%}$) в каждой пробирке по формуле (2):

$$Y_{\%} = \frac{A_p - A_o}{A_k - A_o} \times 100\%,$$

где: A_p – среднее значение оптической плотности разведений гемолитической сыворотки;

A_o – среднее значение оптической плотности контрольных проб без гемолиза;

A_k – среднее значение оптической плотности контрольных проб с полным гемолизом.

Строят график, откладывая по оси ординат степень гемолиза в процентах, а по оси абсцисс – обратные значения соответствующего разведения гемолитической сыворотки.

Результаты титрования гемолитической сыворотки считают достоверными, если максимальная степень гемолиза находится в пределах 50–70%. Если максимальная степень гемолиза не находится в этих пределах, титрование повторяют с использованием менее или более разбавленного раствора комплемента, соответственно.

Определяют минимальное разведение, при котором дальнейшее повышение количества гемолитической сыворотки не вызывает существенного повышения степени гемолиза. Это разведение определяется как одна минимальная гемолитическая единица (1 МГЕ) в 1 мл.

В дальнейшем для приготовления суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана используют разведение гемолитической сыворотки, содержащее 2 МГЕ/мл (например, если за 1 МГЕ/мл принимают разведение 1:500, то 2 МГЕ/мл – 1:250).

При проведении последующих испытаний с использованием образцов гемолитической сыворотки той же серии можно использовать данные, полученные ранее.

Рекомендуется определять гемолитическую активность используемой серии гемолитической сыворотки не реже одного раза в 6 месяцев.

Титрование комплемента

Готовят исходное разведение комплемента (например, 1:250) с помощью буферного раствора, затем из него готовят ряд разведений в двух повторностях в соответствии с Таблицей 2:

Таблица 2 - Порядок приготовления разведений комплемента

Номера пробирок	Объем разведения комплемента (например, 1:250), мл	Объем буферного раствора, мл
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,3 мл буферного раствора.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,3 мл воды очищенной.

Затем в каждую пробирку (с разведениями комплемента пробирки 1-12 и контрольными пробами) добавляют по 0,2 мл гемолитической системы (состоит из суспензии эритроцитов барана и гемолитической сыворотки), тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин; затем охлаждают 10 мин при температуре $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кюветах с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм. Раствор сравнения – буферный раствор.

Рассчитывают степень гемолиза (Y) по формуле (3):

$$Y = \frac{A_p - A_o}{A_k - A_o},$$

где: A_p – среднее значение оптической плотности испытуемой пробы;

A_o – среднее значение оптической плотности контрольной пробы без гемолиза;

A_k – среднее значение оптической плотности контрольной пробы с полным гемолизом.

С помощью программного обеспечения или на миллиметровой бумаге с логарифмическим масштабом строят график со значениями $Y/(1-Y)$ по оси абсцисс и количеством разведенного комплемента (в мл) по оси ординат. Получают оптимизированную кривую (при построении графика учитываются значения степени гемолиза, находящиеся в диапазоне от 0,15 до 0,85; значения, находящиеся за пределами указанного диапазона не учитываются), соответствующую нанесенным точкам, и определяют ординату для дозы комплемента, приводящей к 50% гемолизу, т.е. $Y/(1-Y)=1$.

Вычисляют активность комплемента в исходном растворе, выраженную в гемолитических единицах ($CH_{50}/мл$), по формуле (4):

$$CH_{50}/мл = \frac{B}{C \times 5},$$

где: B – величина, обратная степени разведения комплемента;

C – объем разведенного комплемента (мл), вызывающий 50% гемолиз ($Y/(1-Y)=1$);

5 – множитель для учета количества эритроцитов.

Результат титрования комплемента считают достоверным при условии, что наклон прямой составляет от 0,15 до 0,40, предпочтительно в интервале 0,18-0,30.

Определение антикомплементарной активности испытуемого образца иммуноглобулина

Проверяют pH испытуемого образца иммуноглобулина потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». При pH менее 7,0 его доводят до значений 7,0-7,3 с помощью 0,1М раствора натрия гидроксида (если нет иных указаний в фармакопейной статье). Определяют содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка». — Готовят пробу испытуемого образца иммуноглобулина, в зависимости от содержания белка. Например, при содержании белка в испытуемом образце иммуноглобулина 50 мг/мл, к 0,2 мл раствора иммуноглобулина добавляют 0,6 мл буферного раствора. Если содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина отличается от 50 мг/мл, используют большие или меньшие объемы испытуемого образца иммуноглобулина. Точный объем испытуемого образца иммуноглобулина (V) в мл рассчитывают по формуле (5):

$$V = \frac{50 \times 0,2}{C},$$

где 50 – необходимое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, мг/мл;

0,2 – объем испытуемого образца иммуноглобулина, взятый для испытания, мл;

C – фактическое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, мг/мл.

Объем пробы доводят буферным раствором до 0,8 мл.

Подготовку положительного и отрицательного контролей с использованием стандартного образца иммуноглобулина человека (BRP или аналогичного) проводят в соответствии с инструкцией по его применению.

Для приготовления пробы с контролем комплемента в пробирку вносят 0,8 мл буферного раствора.

Во все приготовленные пробы добавляют по 0,2 мл раствора комплемента, содержащего 100 CH₅₀/мл. Конечный объем проб – 1 мл.

Пробирки инкубируют в термостате при температуре $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин.

По истечении срока инкубации готовят разведения 1:50 для проб с контролем комплемента и испытуемым образцом иммуноглобулина. Разведения контрольных образцов (положительный и отрицательный контроль) проводят в соответствии с инструкцией по применению к стандартному образцу.

Проводят определение остаточной активности комплемента (в двух повторностях) в соответствии с Таблицей 3.

Таблица 3 - Порядок подготовки проб для определения остаточной активности комплемента

Номера пробирок	Объем пробы, мл	Объем буферного раствора, мл
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,3 мл буферного раствора.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,3 мл воды очищенной.

Затем в каждую пробирку (пробирки 1-12 и пробирки с контрольными пробами) добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ в

течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм. Раствор сравнения – буферный раствор. Рассчитывают степень гемолиза (Y) по формуле (3) и строят график, как и при титровании комплемента.

Если центрифугирование и/или считывание результатов не может быть проведено немедленно, пробы хранят при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ не более 1 ч.

Учет и интерпретация результатов

Вычисляют по формуле (4) активность комплемента в гемолитических единицах ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) для испытуемого образца иммуноглобулина, контрольных образцов (положительный и отрицательный контроли) и контроля комплемента.

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина (в %) и контрольных образцов (положительный и отрицательный контроли) вычисляют относительно АКА в контроле комплемента, принятой за 100%, по формуле (6):

$$\text{АКА} = \frac{b-a}{b} \times 100 \%,$$

где: b – активность комплемента ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) в контроле комплемента, рассчитанная по формуле (4);

a – активность комплемента ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) в испытуемом образце иммуноглобулина и в контрольных образцах (положительный и отрицательный контроли), рассчитанная по формуле (4).

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина в $\text{CH}_{50}/\text{мг}$ белка рассчитывают по формуле (7):

$$\text{АКА}(\text{CH}_{50}/\text{мг белка}) = \frac{20 \text{ CH}_{50} \times \left(\frac{b-a}{b}\right)}{10},$$

где: 20 CH_{50} – количество комплемента, взятого для испытания;

b – активность комплемента ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) в контроле комплемента, рассчитанная по формуле (4);

a – активность комплемента ($CH_{50}/мл$) в испытуемом образце иммуноглобулина и в контрольных образцах (положительный и отрицательный контроли), рассчитанная по формуле (4);

10 – количество белка иммуноглобулина (мг), взятого для испытания.

Результаты испытания препарата иммуноглобулина считают достоверными, если:

1. Антикомплементарная активность отрицательного и положительного контролей находится в пределах, лимитируемых в инструкции по применению к стандартному образцу;

2. Активность комплемента в контроле комплемента находится в пределах от 80 до 120 $CH_{50}/мл$.

В противном случае проводят повторный анализ.

Примечания

1. Приготовление буферных растворов (желатин-солевого или желатин-барбиталового).

1.1. Приготовление желатин-солевого раствора. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1 г желатина, прибавляют примерно 200 мл воды очищенной и оставляют набухать. Смесь нагревают при температуре $45 \pm 3^\circ C$ до полного растворения. Полученный прозрачный раствор охлаждают до комнатной температуры.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 г натрия хлорида, 0,1 г кальция хлорида безводного, 0,04 г магния хлорида 6-водного, растворяют в небольшом количестве воды очищенной и прибавляют приготовленный раствор желатина. Общий объем раствора доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Доводят pH раствора до 7,2-7,3 с помощью 0,1М раствора натрия гидроксида. Раствор используют свежеприготовленным.

1.2. Приготовление желатин-барбиталового буферного раствора.

1.2.1. Приготовление исходного раствора кальция и магния хлорида. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в небольшом количестве воды очищенной 4,412 г кальция хлорида дигидрата и 20,332 г магния хлорида 6-ти водного, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре $5 \pm 3^\circ C$ в течение 1 мес.

1.2.2. Приготовление исходного барбиталового буферного раствора (pH 7,3). В мерной колбе вместимостью 2000 мл растворяют, постоянно перемешивая, 83,0 г натрия хлорида и 10,192 г барбитала натрия в 1700 мл воды очищенной. Показатель pH доводят до 7,3 1М с помощью раствора

хлористоводородной кислоты. Добавляют 5 мл исходного раствора кальция и магния хлорида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мес.

1.2.3. Приготовление раствора желатина. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,25 г желатина, прибавляют 500 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Полученную смесь нагревают при температуре $45\pm 3^{\circ}\text{C}$ до полного растворения желатина. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Используют только свежеприготовленный раствор.

1.2.4. Приготовление желатин-барбиталового буферного раствора. Прибавляют 4 части раствора желатина к 1 части исходного барбиталового буферного раствора, тщательно перемешивают и доводят pH до 7,2-7,3 с помощью 1М раствора натрия гидроксида или 1М раствором хлористоводородной кислоты. Раствор используют свежеприготовленным.

2. Подготовка контрольных образцов. Подготовку отрицательного и положительного контролей осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к стандартному образцу (СО) иммуноглобулина человека.

3. Приготовление стабилизированной крови барана. Берут один объем крови барана и один объем цитратного раствора, перемешивают. Хранят при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Стабилизированную кровь барана можно использовать в течение 28 дней, но не ранее чем через 7 дней после взятия.

4. Приготовление цитратного раствора. Растворяют в 750 мл воды очищенной 20,5 г глюкозы, 8,0 г натрия лимоннокислого трехзамещенного и 4,2 г натрия хлорида, устанавливают pH раствора 6,1 раствором лимонной кислоты (100 г/л), доводят объем раствора до 1000 мл водой очищенной. Стерилизуют текучим паром в течение 30 мин при температуре 100°C . Хранят при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мес.

5. Приготовление гемолитической системы (суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана). Гемолитическая сыворотка – иммунная сыворотка против эритроцитов барана, которую получают путем иммунизации кроликов. (Такие гемолитические сыворотки предлагаются рядом коммерческих источников).

Для получения гемолитической системы гемолитическую сыворотку, разведенную до 2 МГЕ/мл, добавляют к 5% суспензии эритроцитов барана в соотношении 1:1. Инкубируют в термостате при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут, после чего хранят при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и используют в течение 6 часов.

6. Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от сгустка крови

центрифугированием при температуре 4°C. Хранят в небольших количествах при температуре ниже минус 70°C.

7. Приготовление раствора комплемента, содержащего 100 CH₅₀/мл. В зависимости от исходной активности комплемента 1 мл раствора комплемента разбавляют буферным раствором до содержания 100 CH₅₀/мл.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Определение содержания
антиальфастафилолизина
(специфических антител)
в лекарственных препаратах
из сыворотки крови человека
и животных**

ОФС.1.8.2.0008.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения содержания антиальфастафилолизина (специфических антител), предназначенный для оценки специфической активности препаратов крови (донорская плазма, плазма для фракционирования, иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного и внутримышечного введения, иммуноглобулин человека антистафилококковый для внутримышечного введения), иммуногенности анатоксинов стафилококковых (раствора и суспензии) для подкожного введения, а также для определения активности токсина стафилококкового диагностического. С помощью описываемого метода определяют содержание антиальфастафилолизина – специфических антител к экзотоксину стафилококковому (син.: альфа-токсин, токсин стафилококковый, альфастафилолизин).

Метод основан на способности специфических антител нейтрализовать гемолитические свойства стафилококкового альфатоксина.

Используемые ингредиенты:

- 0,9% раствор натрия хлорида ($\text{pH } 7,2 \pm 0,1$);
- вода очищенная;
- стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина;

- эритроциты кролика;
- набор реагентов для определения уровня антиальфастафилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных (токсин стафилококковый диагностический).

Стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина представляет собой раствор очищенной концентрированной сыворотки крови лошади в глицерине, полученный путем иммунизации лошадей стафилококковым анатоксином, который содержит антитела к альфастафилолизину. Активность стандартного образца (СО) выражается в Международных единицах (МЕ).

Для того, чтобы исключить искажение результатов испытания специфической активности препаратов, обязательно определяют уровень содержания антиальфастафилолизина в сыворотке крови кроликов-доноров. Пригодными считаются те кролики, в сыворотке крови которых антиальфастафилолизин отсутствует или содержится в количестве не более 0,125 МЕ/мл. Кролик в качестве донора может быть использован в течение 3 – 6 мес.

Кровь берут из сердца или краевой вены уха кролика-донора в стерильный сосуд со стеклянными бусами и дефибринируют её, встряхивая флакон круговыми движениями в течение 10 - 15 мин. Кровь освобождают от сгустка фибрина и бус, в асептических условиях фильтруя ее в стерильный флакон через стерильную марлю, сложенную в три слоя. Дефибринированная кровь пригодна для приготовления взвеси эритроцитов в течение 2 дней при условии хранения её при температуре от 2 до 8°C.

Кровь кролика можно консервировать в равных объемах модифицированного раствора Олсвера.

Примечание

Приготовление модифицированного раствора Олсвера. В 1200 мл воды очищенной растворяют 24,6 г глюкозы, 9,6 г натрия цитрата, 5,04 г натрия хлорида, доводят pH до 6,1 с помощью 1М раствора лимонной кислоты и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Консервированная кровь пригодна для приготовления взвеси эритроцитов в течение 30 дней при условии хранения при температуре от 2 до 8⁰С.

Методика испытания

В день проведения испытания эритроциты кролика из дефибринированной или консервированной крови отмывают трижды пятикратным объемом 0,9% раствора натрия хлорида и последующего центрифугирования в течение 15 мин при 1500 об/мин.

Из осадка отмывтых эритроцитов готовят 15% суспензию, используя 0,9% раствор натрия хлорида. Для стандартизации методики устанавливают концентрацию эритроцитов в приготовленной взвеси, определяя оптическую плотность гемолизированного раствора эритроцитов. Для этого к 0,5 мл 15% взвеси эритроцитов кролика добавляют 2,0 мл воды очищенной, перемешивают круговыми движениями, после чего разводят полученный раствор 1:6.

После приготовления раствора гемолизированных эритроцитов измеряют оптическую плотность раствора гемоглобина, полученного в результате гемолиза, при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 мм. Контролем служит вода очищенная. Величина оптической плотности приготовленного раствора должна быть равна $0,53 \pm 0,01$.

В случае, если этот показатель выше 0,54, к приготовленной 15% взвеси эритроцитов добавляют 0,9% раствор натрия хлорида в объеме ($V_{доб}$), рассчитанном по формуле:

$$V_{доб} = V_{нач} \times A_{400} / 0,53 - V_{нач},$$

где: $V_{нач}$ – начальный объем 15 % взвеси эритроцитов;

A_{400} – значение оптической плотности гемолизированного раствора.

В случае, если значение оптической плотности ниже 0,52, то добавляют отмывтые эритроциты в объеме ($V_{эр.доб}$), рассчитанном по формуле:

$$V_{эр.доб} = V_{эр.исх} \times 0,53 / A_{400} - V_{эр.исх},$$

где: $V_{\text{эр.исх}}$ – объем отмытых эритроцитов, использованных для приготовления 15% взвеси, мл;

A_{400} – значение оптической плотности гемолизированного раствора.

После добавления 0,9% раствора натрия хлорида или отмытых эритроцитов следует вновь определить оптическую плотность приготовленного раствора. Приготовленная 15% взвесь эритроцитов с установленным значением оптической плотности пригодна для проведения анализа в течение дня.

Токсин стафилококковый диагностический представляет собой фильтрат бульонной культуры токсигенного штамма стафилококка 0-15 и выпускается с установленным значением Lh (лимит гемолитического действия токсина). Лимит гемолитического действия токсина (Lh) – это минимальное количество стафилококкового токсина, соответствующее 1 МЕ (Международной единице) СО антиальфа-стафилолизина, которое вызывает почти полный гемолиз (+++) взятых в опыт эритроцитов кролика.

В день проведения испытания специфической активности препаратов необходимо установить Lh токсина в условиях опыта, т.к. вследствие влияния различных факторов (нестабильность стафилококкового токсина в процессе хранения, возможные колебания чувствительности отдельных партий эритроцитов кролика и др.) результаты могут отклоняться в ту или иную сторону.

Методика определения лимита гемолитического действия стафилококкового токсина

Разведения токсина готовят, исходя из величины Lh, указанной в паспорте препарата. Осторожно, не касаясь стенок, в 7 пробирок вносят испытуемый токсин: в среднюю – в объеме, равном величине Lh по паспорту, в остальные – в соответствующих объемах с интервалом в 0,01 мл в стороны убывания и возрастания от средней пробирки. Затем в каждую пробирку добавляют 0,9% раствор натрия хлорида до объема 1,0 мл.

СО антиальфа-стафилолизина разводят до содержания 1 МЕ

антиальфа-стафилолизина в 1,0 мл и добавляют по 1,0 мл приготовленных разведений токсина в каждую пробирку с СО. В контрольную пробирку (контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика) вносят 2,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Пробирки со смесью антигена (стафилотоксина) с антителом (СО антиальфа-стафилолизина) осторожно встряхивают и инкубируют при температуре от 18 до 22°C в течение 15 мин. Затем в каждую пробирку ряда (опытные и контрольную) добавляют по 0,1 мл свежеприготовленной 15% взвеси эритроцитов с установленной величиной оптической плотности. Пробирки снова осторожно встряхивают и инкубируют в термостате при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч.

Результаты учитывают визуально по степени гемолиза:

- (++++) – полный гемолиз эритроцитов;
- (+++) – почти полный гемолиз эритроцитов;
- (++) – частичный гемолиз (50%-ный гемолиз эритроцитов);
- (+) – следы гемолиза эритроцитов;
- (-) – отсутствие гемолиза эритроцитов.

В контрольной пробирке гемолиз эритроцитов должен отсутствовать.

Количество токсина, содержащееся в первой пробирке, в которой произошел почти полный гемолиз (+++) эритроцитов, принимается за лимит его гемолитического действия в условиях опыта.

Методика определения содержания антиальфа-стафилолизина в испытуемых образцах в концентрации 0,2 МЕ/мл и выше

Стафилококковый токсин с установленной величиной Lh непосредственно перед проведением анализа разводят 0,9% раствором натрия хлорида до содержания Lh/5 в 1,0 мл (рабочий раствор токсина). Количество исходного токсина и объем рабочего раствора стафилококкового токсина, необходимый для проведения анализа, рассчитывают, исходя из установленной величины Lh токсина и количества пробирок, необходимых для проведения анализа.

Для определения концентрации антиальфа-стафилолизина в 1 мл

испытуемого сывороточного препарата готовят его разведения с учетом предполагаемого содержания антиальфастафилолизина (в МЕ/мл) по схеме (табл. 1).

Таблица 1 - Схема разведения исследуемых препаратов

№ пробирки	Предполагаемое содержание антиальфастафилолизина, (МЕ/мл)	Разведение препарата	Количество вносимого в пробирку	
			исследуемого препарата, мл	0,9% раствора натрия хлорида, мл
1	0,2	-	0,5	-
2	0,5	1:2,5	1,0	1,5
3	1	1:5	1,0	4,0
4	2	1:10	1,0	9,0
5	3	1:15	0,5 (из пробирки № 3)	1,0
6	4	1:20	0,5 (из пробирки № 3)	1,5
7	5	1:25	0,5 (из пробирки № 3)	2,0
8	6	1:30	0,5 (из пробирки № 3)	2,5
9	7	1:35	0,5 (из пробирки № 3)	3,0
10	8	1:40	0,5 (из пробирки № 3)	3,5
11	9	1:45	0,5 (из пробирки № 3)	4,0
12	10	1:50	0,5 (из пробирки № 3)	4,5
13	14	1:70	0,5 (из пробирки № 4)	3,0
14	16	1:80	0,5 (из пробирки № 4)	3,5
15	18	1:90	0,5 (из пробирки № 4)	4,0
16	20	1:100	0,5 (из пробирки № 4)	4,5
17	22	1:110	0,5 (из пробирки № 4)	5,0
18	24	1:120	0,5 (из пробирки № 4)	5,5
19	26	1:130	0,5 (из пробирки № 4)	6,0
20	28	1:140	0,5 (из пробирки № 4)	6,5 и т.д

Каждый опыт сопровождается контролем, необходимым для подтверждения соблюдения условий проведения испытания. Контроль предусматривает оценку точности взятой в опыт дозы стафилококкового токсина и, при необходимости, коррекцию результатов опыта с помощью СО антиальфастафилолизина.

СО антиальфастафилолизина разводят 0,9% раствором натрия хлорида

до содержания 1 МЕ антиальфа-стафилолизина в 1 мл. Далее из этого разведения, содержащего 1 МЕ/мл, готовят следующие разведения по схеме (табл.2).

Таблица 2 – Схема разведения СО антиальфа-стафилолизина

№ пробирки	Концентрация СО антиальфа-стафилолизина, МЕ/0,5 мл	Количество вносимого в пробирку	
		СО антиальфа-стафилолизина в разведении 1 МЕ/мл, мл	0,9% раствора натрия хлорида, мл
1	0,12	1,0	3,17
2	0,11	1,0	3,55
3	0,10	1,0	4,00
4	0,09	1,0	4,56
5	0,08	1,0	5,25

В чистые пробирки вносят по 0,5 мл необходимых для анализа разведений испытуемого препарата (опытный ряд) и по 0,5 мл приготовленных разведений СО антиальфа-стафилолизина (контрольный ряд), затем в каждую пробирку вносят по 0,5 мл приготовленного разведения стафилококкового токсина (рабочего раствора токсина). Пробирки осторожно встряхивают круговыми движениями и инкубируют при температуре от 18 до 22 °С в течение 15 мин.

Затем в каждую пробирку опытного и контрольного рядов добавляют по 0,05 мл свежеприготовленной 15% взвеси эритроцитов кролика с установленной величиной оптической плотности. Пробирки вновь осторожно встряхивают круговыми движениями и инкубируют при температуре (37,0±0,5)°С в течение 1 ч.

После инкубации проводят учет результатов реакции по степени выраженности гемолиза.

Учет результатов начинают с визуальной оценки степени гемолиза. Для этого в контрольном и опытном рядах отбирают последнюю пробирку, в которой отмечается начало гемолиза (+), все пробирки с 50% (частичным)

гемолизом (++) и первую пробирку с почти полным гемолизом (+++). Для остановки гемолиза отобранные пробирки помещают в холодильник на 10 минут при температуре 2-8⁰С. После охлаждения пробирки центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость из каждой пробирки быстро и осторожно отбирают в чистые сухие пробирки и определяют оптическую плотность при длине волны 400 нм, используя кюветы с толщиной слоя 1 мм. Раствором сравнения служит 0,9% раствор натрия хлорида. Оптическая плотность, соответствующая 50% гемолизу эритроцитов, должна быть равна 0,35±0,05.

Аналогичным образом определяют оптическую плотность надосадочной жидкости в пробирках контрольного ряда, содержащих разведения СО антиальфастафилолизина. При оптимальных условиях опыта 50% гемолиз эритроцитов и величина оптической плотности, равная 0,35±0,05, регистрируются в пробирке, содержащей 0,1 МЕ СО антиальфастафилолизина, т.е. расчетная доза Lh/10 точно соответствует её истинному значению. В этом случае пробирка опытного ряда, в которой зарегистрирован гемолиз 50% эритроцитов, содержит 0,1 МЕ антиальфастафилолизина в объеме 0,5 мл, что соответствует содержанию 0,2 МЕ в мл. Для расчета содержания антиальфастафилолизина в 1,0 мл неразведенного исследуемого образца, необходимо 0,2 МЕ умножить на величину разведения в данной пробирке. Например, первая пробирка, в которой надосадочная жидкость имеет величину оптической плотности 0,35±0,05, содержит препарат в разведении 1:100; следовательно, 1 мл неразведенного препарата содержит 0,2 МЕх100=20 МЕ.

В результате влияния различных факторов возможно несоответствие дозы токсина, используемой в опыте, получаемому расчетному значению. В таких случаях при расчете специфической активности испытуемых препаратов применяется коэффициент пересчета (К), определяемый для каждого конкретного анализа по формуле:

$$K = a/0,1,$$

где: а — концентрация (количество МЕ) СО антиальфастафилолизина в первой пробирке контрольного ряда, в которой зарегистрирован гемолиз 50% эритроцитов, дающий оптическую плотность надосадочной жидкости $0,35 \pm 0,05$.

Методика определения содержания антиальфастафилолизина в испытуемых сывороточных образцах в концентрации не более 0,125 МЕ/мл

Для исключения искажения результатов при определении специфической активности иммуноглобулинов и препаратов крови, необходимо определять содержание антиальфастафилолизина в сыворотке крови кроликов, используемых в качестве доноров для получения эритроцитов, а также при подборе кроликов для проведения испытания иммуногенности (специфической активности), специфической безвредности и антигенной активности стафилококковых анатоксинов. Для таких целей пригодны кролики, в сыворотке крови которых антиальфастафилолизин отсутствует или содержится в количестве не более 0,125 МЕ/мл.

Для определения малых концентраций антиальфастафилолизина можно использовать метод титрования препарата с использованием более высоких разведений токсина (Lh/20, Lh/40, Lh/80, и т.д.).

Определение содержания антиальфастафилолизина в сыворотках крови кроликов проводят следующим образом: испытуемые сыворотки разводят в 5 раз 0,9% раствором натрия хлорида. Для этого в пробирку с 4,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида добавляют 1,0 мл сыворотки. Затем в необходимых количествах готовят разведения стафилококкового токсина с содержанием в 0,5 мл Lh/40 и Lh/80. Для приготовления разведений токсина используют токсин с точно установленной в день испытания величиной Lh.

Разведенную в 5 раз сыворотку разливают по 0,5 мл в 3 пробирки, затем в первую и вторую добавляют по 0,5 мл токсина в разведениях Lh/40 и Lh/80 соответственно, а в третью, являющуюся контрольной, вносят 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Для контроля наличия литического действия токсина берут еще 2 пустые пробирки и наливают

в них по 0,5 мл каждого приготовленного разведения токсина и по 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Пробирки осторожно встряхивают, оставляют при температуре 18 -22°C в течение 15 мин, а затем во все пробирки добавляют 0,05 мл свежеприготовленной в день испытания 15% взвеси эритроцитов кролика-донора. Пробирки вновь осторожно встряхивают и инкубируют при температуре (37±0,5)°C в течение 1 ч. Результаты учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов (табл.3). В контрольной пробирке №3 (без добавления токсина) гемолиз эритроцитов должен отсутствовать; в контрольных пробирках с соответствующими разведениями токсина должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

Таблица 3 - Примеры оценки результатов опыта

№ кролика (сыворотки)	Степень гемолиза в пробирках			Оценка результатов (количество МЕ/мл сыворотки)	Вывод
	Lh/40	Lh/80	Контроль сывороток		
1	++++	+++	—	< 0,125 ME	Годеи
2	++++	++	—	0,125 ME	Возможно годеи
3	+++	+ (—)	—	> 0,125< 0,25 ME	Не годеи
4	++	—	—	0,25 ME	Не годеи
5	+ (—)	—	—	> 0,25 ME	Не годеи
Контроль токсина	++++	++++			

Результаты следует считать относительно точными, поскольку опыт не сопровождается контролем с СО антиальфастафилолизина. Необходимость включения в опыт контрольного ряда СО в данном случае не оправдана, принимая во внимание цели испытания и концентрацию антиальфастафилолизина. При необходимости точного определения малых концентраций антиальфастафилолизина следует использовать методику, описанную выше, но использовать более высокие разведения токсина.

**Определение однородности
лекарственных препаратов
из сыворотки крови человека
и животных методом
электрофореза на плёнках
из ацетата целлюлозы**

ОФС.1.8.2.0009.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы, который предназначен для определения однородности (идентичности) иммунобиологических лекарственных препаратов (иммуноглобулинов). Метод основан на различной скорости перемещения белков в электрическом поле в зависимости от соотношения основных и кислотных групп белка, рН, ионной силы буферного раствора, величины заряда и молекулярной массы частиц.

Белки движутся в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, движутся к аноду (+), а положительно заряженные – к катоду (–). По скорости движения в электрическом поле белки делятся на 5 основных фракций: альбумины, α_1 -глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины. Наименьшей скоростью продвижения обладают γ – глобулины (молекулярная масса 150-160 тыс. кДа); они практически остаются на линии старта, т.к. их заряд близок к нейтральному. Альбумины обладают выраженным отрицательным зарядом и меньшей молекулярной массой (67-70 тыс. кДа), поэтому в электрическом поле они движутся с наибольшей скоростью и в результате обнаруживаются дальше других белковых фракций

от линии старта. С меньшей скоростью, чем альбумины, в электрическом поле перемещаются α_1 -, α_2 - и β -глобулины.

Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы

На увлажнённую плёнку из ацетата целлюлозы размером 90х90 мм, заправленную в специальную рамку, наносят 2-4 мкл исследуемых образцов (5 образцов в 2-х параллельных определениях) и для идентификации контрольный образец – сыворотка для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Определение проводят в 2-х параллельных определениях. Предварительно в электродные секции камеры (аппарат для электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы) наливают барбиталовый буферный раствор (рН 8,4). Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой подходящий коммерческий буферный раствор с указанным значением рН.

Рамку с пленкой из ацетата целлюлозы помещают в разделительную камеру, закрывают крышкой, включают источник питания (сила тока 8-10 мА, напряжение 100-129 В). Разделение проводят в течение 30-40 мин. После проведения электрофореза снимают крышку разделительной камеры, не допуская попадания конденсационной воды на пленку. Рамку с плёнкой извлекают из камеры, избегая контакта с участками, где происходил электрофорез испытуемых образцов. Пленку достают из рамки пинцетом и дают подсохнуть на воздухе. Затем плёнку обрезают с обоих концов (около 2,5 мм), помещают в кювету с 50 мл раствора красителя и выдерживают в течение не более 5 мин (контакт с красителем в течение более длительного времени может деформировать плёнку). Плёнку вынимают из кюветы и после стекания избыточной жидкости помещают на 5 мин поочерёдно в 3 кюветы, со 100 мл отмывочной жидкости (для ускорения процесса отмытки кювету покачивают). После отмытки фон плёнки должен приобрести бледно-голубое окрашивание или стать почти прозрачным. Далее плёнку тщательно промывают водой, помещают между листами фильтровальной бумаги и слегка промокают.

Идентификацию белковых фракций проводят путём сравнения электрофореграммы испытуемых образцов с электрофореграммой контрольной сыворотки для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Сыворотка должна разделиться не менее, чем на 5 фракций: альбумин, α_1 - и α_2 -глобулины, β -глобулин и γ -глобулин. После проведения электрофореза проводят количественное определение фракций иммуноглобулина путём извлечения краски из плёнки элюирующим раствором с последующим колориметрированием или путём денситометрии электрофореграмм.

Количественное определение фракций иммуноглобулина

Колориметрическое определение. Извлечение краски каждой фракции проводят в 3 мл элюирующего раствора с 2-х параллельных электрофореграмм. Элюцию проводят в течение 40 мин при многократном встряхивании. Оптическую плотность полученного элюата измеряют на спектрофотометре при длине волны 620 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по отношению к элюату неокрашенного участка электрофореграммы. Сумму оптических плотностей всех белковых фракций принимают за 100% и рассчитывают процентное содержание каждой фракции препарата иммуноглобулина.

Денситометрическое определение. Электрофореграммы исследуемых образцов высушивают между листами фильтровальной бумаги в полиэтиленовом пакете (такие условия высушивания исключают деформацию плёнки). Высушенные плёнки просветляют вазелиновым маслом, пропитывая их таким образом, чтобы в плёнке не остались пузырьки воздуха. Для этого плёнку следует держать горизонтально и нижней поверхностью осторожно касаться масла. Избыток вазелинового масла удаляют, промокая плёнку между листами фильтровальной бумаги.

Фракции иммуноглобулина записываются денситометром в виде пиков. Величина площади каждого пика пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком. С помощью автоматического интегратора

площадь каждого пика вычисляют по формуле площади прямоугольника ($h \times d$, где h – максимальная высота пика, d – ширина пика). Сумма площадей всех пиков фракций иммуноглобулина принимается за 100% и вычисляется процентное содержание каждой фракции в испытуемом препарате иммуноглобулина.

Примечания

1. Подготовка плёнки из ацетата целлюлозы. Плёнку смачивают в барбиталовом буферном растворе и гладкой стороной помещают в кювету на поверхность буферного раствора на 2 мин, а затем пинцетом погружают на дно кюветы и выдерживают 5 мин. После этого плёнку вынимают пинцетом, избыток влаги удаляют между листами фильтровальной бумаги и заправляют в рамку, избегая неравномерного натяжения и провисания.

2. Подготовка испытуемых образцов. Испытуемые образцы предварительно обрабатывают 0,05% раствором красителя – бромфенолового синего, используемого для отслеживания продвижения и распределения белковых фракций препарата иммуноглобулина в процессе электрофореза. В пробирку типа Эппендорф помещают 100 мкл испытуемого образца и 10 мкл 0,05% раствора бромфенолового синего и перемешивают. Окрашенные испытуемые образцы в объеме 2-4 мкл помещают в каждую лунку лотка.

3. Приготовление барбиталового буферного раствора (pH 8,4)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 г натрия барбитала, растворяют в 600-700 мл воды очищенной, прибавляют 11 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой другой коммерческий буферный раствор с известным значением pH.

4. Приготовление 1М раствора хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 85 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора до метки и перемешивают.

5. Приготовление красителя. К 0,5 г амидочёрного 10 Б прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной, 3 г трихлоруксусной кислоты и 90 мл этилового спирта и перемешивают. Для полного растворения краситель оставляют на 24 ч. Перед использованием раствор красителя перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

6. Приготовление раствора для отмывки электрофореграмм. В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл помещают 40 мл уксусной кислоты ледяной,

прибавляют 700 мл воды очищенной и перемешивают. Затем объём раствора доводят водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

7. Приготовление элюирующего раствора. Смешивают 10 мл 1М раствора натрия гидроксида с 1 мл 1М раствора натрия эдетата (трилон Б).

Если условия проведения анализа и реагенты отличаются от приведенных в этой статье, они должны быть указаны в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации с изложением иной валидированной методики анализа.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

**Радиофармацевтические
лекарственные препараты**

ОФС.1.11.0001.15
Взамен ст. ГФ XI, вып. 1,
ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0073-07

Радиофармацевтические лекарственные препараты применяются для радионуклидной диагностики и лечения различных заболеваний с использованием методов ядерной медицины.

Радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП) предоставляются для использования учреждениям, располагающим необходимыми условиями для правильной и безопасной работы с ними.

РФЛП диагностического назначения содержат гамма- или позитрон-излучающий радионуклид, являющийся информационным носителем, излучение которого, проникающее за пределы организма, регистрируется внешними детекторами.

В РФЛП терапевтического назначения радионуклид (бета-, альфа-излучатель, радионуклид, распад которого сопровождается электронным захватом или внутренней конверсией электронов) является основным лечебным началом, позволяющим локализовать лечебную дозу излучения непосредственно в органе-мишени и, соответственно, обеспечить минимальное облучение здоровых органов и тканей.

В большинстве случаев химические соединения, входящие в состав диагностических радиофармацевтических препаратов, используются в количествах, не вызывающих фармакологического действия.

Объём производства РФЛП крайне мал по сравнению с другими лекарственными средствами. Достаточно часто количество упаковок в серии

составляет 3-5 единиц. Сроки годности препаратов, в зависимости от периода полураспада соответствующих радионуклидов, составляют от нескольких минут до нескольких суток. Поэтому в контроле качества РФЛП должны преимущественно использоваться экспресс-методы, а также методы, обеспечивающие возможность надёжного определения показателей качества при минимальных объёмах проб.

Термины и определения

Активность радиоактивного вещества (*Activity of radioactive material*) – число ядерных превращений (N), происходящих в данном количестве вещества в короткий промежуток времени (t), отнесённое к этому промежутку времени. Часто это называют абсолютной активностью. Синоним: скорость распада. Обозначается:

$$A = -dN/dt$$

Активность молярная (*Activity, molar*) – для определённого изотопа: активность соединения (A), отнесённая к его количеству в молях (n). Обозначается: $A_m = A/n$.

Активность объемная (*Activity, concentration, Volume activity*) – отношение активности (A) радионуклида в препарате (образце) к объёму (V) препарата (образца). Обозначается: $A_v = A/V$.

Активность удельная (*Activity, specific*) – для определённого изотопа или смеси изотопов: активность вещества (A), отнесённая к его массе (m). Обозначается: $A = A/m$.

Вспомогательное вещество – вещество неорганического или органического происхождения, используемое в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Генератор радионуклидный (*Radionuclide generator*) – система, содержащая фиксированный первичный радионуклид (материнский), как

правило, с более длительным периодом полураспада по отношению к дочернему, в результате распада которого возникают вторичные (дочерние) радионуклиды, извлекаемые посредством элюирования или другим способом и вводимые в состав радиофармацевтического лекарственного препарата.

Изотопы (*Isotopes*) – нуклиды, имеющие одинаковый порядковый номер, но различную атомную массу.

Изотопный индикатор (*Isotope tracer*) – индикатор, который отличается только изотопным составом от интересующего вещества.

Набор для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата (*Kit for radiopharmaceutical preparation*) – реагенты, которые должны быть соединены или смешаны с радионуклидом для получения радиофармацевтического лекарственного препарата, как правило, перед его применением.

Носитель (*Carrier*) – вещество, присутствующее в заметных количествах, которое, совместно с изотопным индикатором определенного вещества, извлекает его в химических и физических процессах или предотвращает участие изотопного индикатора в неспецифичных процессах из-за его низкой концентрации.

Носитель, изотопный (*Carrier, isotope*) – носитель, который отличается только изотопным составом от тех веществ, в следовых количествах, которые он должен извлекать с собой.

Нуклид (*Nuclide*) – разновидность атома, характеризующаяся количеством протонов и нейтронов в его ядре (и, следовательно, его атомным номером Z и атомной массой A), а также его энергетическим состоянием.

Период полураспада (радионуклида) [*Half-life (radionuclide)*] – для отдельно взятого процесса радиоактивного распада: время, за которое исходное число ядер радионуклида уменьшается вдвое. Обозначается: $T_{1/2}$.

Постоянная радиоактивного распада (*Decay constant*) – для радионуклида: вероятность распада его ядра в единицу времени, определяется выражением: $\lambda = -(dN_t / dt) / N_t$, где N_t — общее число ядер данного радионуклида в момент времени t . λ связана с периодом полураспада соотношением:

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \approx \frac{0.693}{T_{1/2}}$$

Активность радионуклида убывает со временем по экспоненциальному закону:

$$A_t = A_0 \times e^{-\lambda t} = A_0 \times e^{-\frac{0.693}{T_{1/2}} t}$$

где A_t и A_0 – активности в момент времени t и 0 соответственно.

Препарат радионуклида без добавления носителя (*Preparation of radionuclide, no carrier added*) – препарат, свободный от стабильных изотопов элемента, к которому принадлежит данный радионуклид. Однако препараты, называемые препаратами **радионуклида без носителя** (*carrier free*), иногда содержат незначительные количества стабильных изотопов того же элемента или его химического аналога. Источником их могут быть побочные ядерные реакции, примеси химических элементов, содержащиеся в реактивах, применяемых при химических операциях и т. д.

Радиоактивный препарат, в котором имеются как радиоактивные, так и стабильные изотопы данного элемента или химического аналога, называется **препаратом с носителем**.

Радиоактивность (*Radioactivity*) – свойство некоторых нуклидов подвергаться радиоактивному распаду.

Радиоизотоп (*Radioisotope*) – радиоактивный изотоп определённого элемента.

Радионуклид (*Radionuclide*) – нуклид, который радиоактивен. Нуклиды,

обладающие нестабильной комбинацией протонов и нейтронов, самопроизвольно с постоянной вероятностью превращаются в стабильные нуклиды или в нуклиды с другой нестабильной комбинацией протонов и нейтронов. О таких нуклидах говорят, что они радиоактивные, и они называются радионуклидами. Исходный радионуклид называют материнским, а образующийся – дочерним.

Радионуклидная чистота (*Radionuclidic purity*) препарата – отношение активности основного радионуклида к общей активности препарата, выраженное в процентах, не является постоянной характеристикой данного препарата, а изменяется с течением времени.

Радионуклидные примеси (*Radionuclidic impurities*) – примеси других радиоактивных нуклидов (как того же, так и других элементов). Количество радионуклидных примесей выражают процентным отношением активности примесей к активности основного нуклида на определённую дату и, при необходимости, время.

Дочерние радионуклиды, образующиеся в результате радиоактивного распада материнского (основного) радионуклида, не считаются радионуклидными примесями: например, ксенон-131м не рассматривается как радионуклидная примесь к йоду-131.

Радиофармацевтический предшественник (*Radiopharmaceutical precursor*) – радиоактивное вещество, предназначенное для введения радионуклидной метки в другое лекарственное средство (радиофармацевтический лекарственный препарат) перед его применением.

Радиофармацевтический лекарственный препарат (*Radiopharmaceutical*) – лекарственный препарат, который в готовой для использования лекарственной форме содержит один или несколько радионуклидов (радиоактивных изотопов), имеющих качественные характеристики, пригодные для диагностического и/или терапевтического применения.

Радиохимическая чистота (*Radiochemical purity*) – отношение активности радионуклида, который присутствует в препарате в заявленной химической форме основного вещества, к общей активности радионуклида в этом препарате, выраженное в процентах.

Радиохимические примеси (*Radiochemical impurities*) – примеси химических соединений, отличных от основного вещества, составляющего препарат, но содержащих тот же радионуклид. Величину радиохимических примесей, т. е. активность содержащегося в них радионуклида, выражают в процентах к общей активности радионуклида в препарате.

Срок годности радиофармацевтического лекарственного препарата (*Storage time of Radiopharmaceutical*) – время, в течение которого радиофармацевтический лекарственный препарат удовлетворяет требованиям фармакопейной статьи или, в случае ее отсутствия, требованиям нормативной документации.

Ультракороткоживущий радионуклид – радионуклид с периодом полураспада до 2 часов.

Химические примеси (*Chemical impurities*) – примеси посторонних химических соединений и элементов, источниками которых являются исходные вещества и реактивы, а также побочные продукты неполно или параллельно протекающих реакций.

Ядерные изомеры (*Nuclear isomers*) – нуклиды, имеющие одинаковый массовый номер и атомный номер, но отличающиеся энергетическим состоянием их ядер.

Единицы активности и энергии

Радиоактивный распад или переход может включать испускание заряженных частиц, захват электронов (ЭЗ) или изомерный переход (ИП). Заряженные частицы, испускаемые ядром, — это альфа-частицы (ядро атома гелия с атомной массой 4) или бета-частицы (отрицательно заряженные,

обычно называемые электронами или положительно заряженные, обычно называемые позитронами). Испускание заряженных частиц ядром может сопровождаться испусканием гамма-квантов. Гамма-кванты также испускаются при изомерном переходе. Такое испускание гамма-квантов может частично сопровождаться выходом электронов, называемых электронами внутренней конверсии. Процесс электронного захвата, приводит к вторичному испусканию рентгеновских лучей (благодаря перегруппировке электронов в атоме). Эта вторичная эмиссия сама по себе может частично замещаться выходом электронов, известных как электроны Оже. Радионуклиды с дефицитом нейтронов могут испускать позитроны. Такие радионуклиды называются позитрон-излучателями. При взаимодействии с электронами позитроны аннигилируют, испуская два гамма-кванта с энергией 511 кэВ каждый, обычно разлетающихся под углом 180° друг к другу. Такой процесс называется аннигиляционным излучением.

Как правило, для обозначения активности радионуклида используются общепринятые единицы измерения в соответствии с ОФС «Единицы международной системы (СИ), используемые в фармакопее».

Для энергии отдельных частиц и фотонов применяют внесистемную единицу электронвольт и десятичные кратные ей единицы: $1 \text{ эВ} = 1,60219 \times 10^{-19} \text{ Дж}$ (приблизительно) $\approx 0,16 \text{ аДж}$. Соответственно $1 \text{ кэВ} \approx 1,6 \times 10^{-16} \text{ Дж} = 0,16 \text{ фДж}$; $1 \text{ МэВ} \approx 1,6 \times 10^{-13} \text{ Дж} = 0,16 \text{ пДж}$.

Основные ядерно-физические характеристики радионуклидов

К основным ядерно-физическим характеристикам радионуклидов, используемых в составе радиофармацевтических лекарственных препаратов, относятся период полураспада, вид, энергетическая характеристика и интенсивность всех компонентов ионизирующего излучения, возникающего как при распаде радионуклида, так и при энергетической разрядке ядра-продукта. Кроме того, для ядерной медицины важны и характеристики рентгеновского излучения атома, образующегося в результате распада радионуклида [Приложение 1].

Основные ядерно-физические характеристики для радионуклидов, входящих в состав РФЛП, а также используемых в составе стандартных радиоактивных растворов и источников, применяемых для аттестации РФЛП, возможных примесей, представлены в Приложении 1 к настоящей статье.

Защита от излучений

При работе с радиоактивными препаратами необходима соответствующая защита от излучения этих препаратов. Защита имеет своей целью предохранение людей от вредного воздействия радиации, а также снижение фоновых показаний измерительных приборов, регистрирующих ионизирующее излучение.

Проникающая способность каждого вида излучения зависит от природы излучения и его энергии.

Защита от внешнего альфа- и бета-излучения радиоактивных препаратов осуществляется сравнительно просто вследствие малой проникающей способности этих излучений. Альфа- и бета-излучения характеризуются определенными величинами пробега альфа- и бета-частиц, т.е. расстоянием, на которое они могут проникать в вещество. Альфа-частицы поглощаются резиновыми перчатками, одеждой, стенками стеклянной ампулы и т.п. Пробег бета-частиц в воздухе в зависимости от их энергии составляет величину от сантиметров до нескольких метров. Для защиты от бета-излучения применяют материалы с малым атомным номером, например, специальные экраны из плексигласа, контейнеры из алюминия и пластмасс и т.п. Однако при работе с высокоактивными препаратами следует принимать меры для защиты от тормозного излучения – вторичного излучения, возникающего при прохождении бета-частиц через вещество. По своей природе тормозное излучение является фотонным ионизирующим излучением. Поэтому при работе с высокоактивными препаратами, содержащими бета-излучающие радионуклиды, применяют комбинированную защиту, в которой внутренний слой (со стороны источника) делается из вещества с малым атомным номером для поглощения

бета-излучения, а внешний – из вещества с бóльшим атомным номером для ослабления тормозного излучения.

Гамма-излучение в отличие от альфа- и бета-излучения не характеризуется определенным пробегом в веществе – оно поглощается по мере прохождения через вещество по экспоненциальному закону. Наиболее эффективно поглощают гамма-излучение вещества с большим атомным номером, например свинец, вольфрам, уран. Гамма-излучение определенной энергии можно характеризовать толщиной **слоя половинного ослабления (полутолщина ослабления)** в веществе. Это та толщина защитного материала, которая ослабляет первоначальную интенсивность излучения в 2 раза. Например, через защитный материал, толщина которого равна 7 слоям половинного ослабления (полутолщинам), проходит менее 1 % излучения незащищённого источника.

Защита от гамма-излучения радиоактивных препаратов достигается не только применением поглощающих экранов, но также и путём увеличения расстояния от препарата (интенсивность излучения обратно пропорциональна квадрату расстояния от препарата).

Радионуклидные генераторы

В радионуклидных генераторных системах (см. выше определение «Генератор радионуклидный») используется относительно долгоживущий материнский радионуклид, который распадается с образованием дочернего радионуклида, обычно с более коротким периодом полураспада. За счёт отделения дочернего радионуклида от материнского химическим или физическим способом можно использовать дочерний радионуклид на значительных расстояниях от производства генераторов. Известно более 100 генераторных пар радионуклидов, однако в медицине используют не более 10. В современной радионуклидной диагностике около 80 % процедур выполняют с препаратами, получаемыми на основе генератора технеция-99м. Препараты получают, как правило, в медицинских организациях с использованием наборов для приготовления радиофармацевтических

лекарственных препаратов, и элюата из генератора. В состав наборов могут входить лиофилизаты, растворы. В данном случае элюат генератора является одновременно растворителем для лиофилизата и исходным раствором радионуклида, то есть **активной фармацевтической субстанцией**. Иногда вместо лиофилизата для приготовления РФЛП может быть использован раствор или набор реагентов, включающий несколько флаконов, содержащих лиофилизаты и/или растворы.

В ряде случаев возможно приготовление РФЛП из раствора радионуклида промышленного производства (например, растворы индия-111, технеция-99м, рения-188 и др.) и набора реагентов.

МАТЕРИАЛЫ МИШЕНЕЙ

Изотопный состав и чистота материала мишени определяют относительное содержание нужного радионуклида и радионуклидных примесей. Использование изотопнообогащенных материалов мишеней, в которых содержание требуемого нуклида искусственно увеличено, может увеличить выход реакции и чистоту нужного радионуклида. Химическая форма, чистота, физическое состояние и химические побочные продукты, так же, как условия облучения, прямое физическое и химическое окружение, определяют химическое состояние и химическую чистоту получаемого радионуклида.

При производстве радионуклидов, особенно короткоживущих, не всегда возможно определить все эти критерии качества перед дальнейшим получением радионуклида и соответствующих РФЛП. Поэтому каждая партия материала мишени должна быть протестирована в пробных производственных циклах перед их использованием в рутинном производстве радионуклида и приготовлении РФЛП. Это необходимо проводить для подтверждения того, что в результате процесса производства в описанных условиях будет получен радионуклид в необходимых количествах и нужного качества.

Для облучения потоком частиц материал мишени находится в

контейнере (ампуле) и/или мишенном устройстве в газообразном, жидком или твёрдом состоянии. Необходимо убедиться в том, что в процессе облучения (температура, давление, время) не происходит взаимодействия между контейнером и его содержимым. При облучении заряженными частицами держатель материала мишени обычно сделан из подходящего металла с входом-выходом, окружающей охлаждающей системой и, как правило, с окном из тонкой металлической фольги. Вид и толщина окна мишени могут влиять на выход ядерной реакции, а также на радионуклидную чистоту.

Предшественники (исходные соединения) для синтеза

Обычно эти предшественники не производятся в больших количествах. Некоторые предшественники синтезируют непосредственно в радиофармацевтических лабораториях, другие поставляются специальными производителями или лабораториями.

Тесты на подлинность, химическую чистоту и анализы должны проводиться по аккредитованным методикам. Рекомендуется предварительное тестирование предшественников в пробном производственном цикле перед их использованием для производства РФЛП и подтверждение, что в указанных условиях производства использование данного предшественника приводит к получению РФЛП в требуемых количествах и с заданным качеством.

Производство и/или изготовление РФЛП должно быть организовано в контролируемых зонах, в которых выполняются требования к окружающей среде и радиационной безопасности. Все технологические операции должны выполняться в специальных помещениях и на специальном оборудовании, предназначенном для производства/изготовления радиофармацевтических препаратов. Различные рабочие зоны должны быть ясно определены и разделены, особенно в отношении однонаправленного движения материалов, предшественников и готовых продуктов, чтобы избежать смешивания и использования не по назначению. Одновременное производство и/или

изготовление различных РФЛП в одной рабочей зоне (горячей камере, ламинарной зоне или шкафу) не допускается, что вызвано необходимостью снижения до минимума риска перекрестного загрязнения радиоактивными веществами или смешивания исходных материалов.

Приготовление дозированной формы конечного РФЛП в практической ядерной медицине обычно включает конкретную (лимитированную) активность на согласованную с потребителем дату (и, при необходимости, время) поставки готового к использованию РФЛП, генераторов, наборов и радиофармацевтических предшественников. Все условия, которые могут влиять на качество продукта (например, радиохимическая чистота и стерильность), должны быть чётко определены и должны включать допустимые значения для защиты от радиоактивности.

Перечень показателей качества, которым должны соответствовать радиофармацевтические лекарственные препараты промышленного производства и/или изготавливаемые в медицинских учреждениях

1. Препараты промышленного производства:

- состав
- описание;
- подлинность;
- pH;
- объёмная активность;
- радионуклидные примеси;
- радиохимическая чистота (радиохимические примеси);
- химические примеси;
- количественное определение;
- физиологическое распределение в тканях организма (при необходимости);
- показатели качества, характеризующие моноклональные антитела, в случае их наличия;
- бактериальные эндотоксины или пирогенность;
- стерильность;

- упаковка;
- маркировка;
- транспортирование;
- хранение;
- срок годности.

2. Препараты, изготавливаемые в медицинских учреждениях:

- состав;
- описание;
- растворимость;
- подлинность;
- прозрачность;*
- цветность;*
- pH;*
- показатели качества, характеризующие моноклональные антитела, в случае их наличия;
- потеря в массе при высушивании;
- механические включения (видимые, невидимые);
- количественное определение;
- бактериальные эндотоксины или пирогенность;
- стерильность;
- упаковка;
- маркировка;
- транспортирование;
- хранение;
- срок годности.

* Показатели качества для восстановленного раствора.

Препарат:

- состав;
- описание;

- pH;
- объёмная активность;
- радиохимическая чистота (радиохимические примеси);
- хранение, включая меры предосторожности;
- срок годности.

При определении показателей качества радиофармацевтических лекарственных препаратов руководствуются требованиями общих фармакопейных статей (ОФС), регламентирующих методы и методики фармакопейного анализа: ОФС «Растворимость», ОФС «Ионометрия», ОФС «Стерильность», ОФС «Бактериальные эндотоксины», соответствующими ОФС для испытания на чистоту и допустимые пределы примесей и др., а также ОФС «Сроки годности лекарственных средств».

Установление подлинности по радионуклиду

Каждый радионуклид и ядерный изомер характеризуются периодом полураспада и специфическими, присущими только ему спектрами (энергий) ионизирующих излучений. К ним относятся спектры альфа-, бета-, гамма-излучения, конверсионных и Оже-электронов, тормозного излучения, характеристического рентгеновского излучения.

Форму и количественные характеристики каждого спектра, а также значение $T_{1/2}$ используют для проверки подлинности радионуклида.

Индивидуальными характеристиками радионуклидов могут служить также аппаратные спектры, снимаемые в строго воспроизводимых условиях; их используют для определения подлинности радионуклидов в РФЛП.

Подлинность радионуклида в препарате считают подтверждённой, если аппаратный спектр ионизирующего излучения, снятый с источником, приготовленным из данного РФЛП, идентичен спектру, полученному с образцовым источником или источником, приготовленным из образцового раствора с тем же радионуклидом, и снятому в тех же условиях. Естественно, предполагается, что спектр должен быть скорректирован на вклад от

радионуклидных примесей, если они имеются в РФЛП.

Идентификацию радионуклидов проводят:

- по спектру (гамма-, бета- и рентгеновское излучение);
- по слою половинного ослабления (бета-излучение);
- по периоду полураспада (любое излучение).

Спектрометрия

Жидкостные сцинтилляционные счётчики используют для получения спектра α - и β -излучателей (смотри измерение активности).

Гамма-спектрометр используют для идентификации радионуклидов по энергии и интенсивности гамма-квантов или рентгеновских лучей.

Германиевый полупроводниковый детектор предпочтительно использовать для гамма- и рентгеновской спектрометрии.

Сцинтилляционный детектор – NaI-Tl — также используют, но он имеет более низкое энергетическое разрешение.

Гамма-детектор калибруют, используя стандартные источники, так как эффективность детектирования зависит от энергии гамма-квантов и рентгеновских лучей, а также от формы источника и расстояния между детектором и источником. Эффективность детектора может быть измерена с использованием калиброванного источника измеряемого радионуклида или, (для обычной работы) по графику эффективность – энергия гамма-квантов и рентгеновских лучей, построенному с использованием нескольких калибровочных источников различных радионуклидов.

Гамма и рентгеновский спектр радионуклида, который испускает гамма-кванты и/или рентгеновское излучение, уникален для этого нуклида и характеризуется энергиями и количеством фотонов с определённой энергией, испускаемой при переходе с одного энергетического уровня на другой. Это свойство используют при идентификации радионуклидов, присутствующих в источнике, и в определении их количества, что обеспечивает оценку наличия радионуклидной примеси путем детектирования других пиков,

отличающихся от ожидаемых.

Слой половинного ослабления

Для идентификации чистых бета-излучателей рекомендуется определять граничные энергии бета-спектров или зависящие от них параметры. Например, идентификацию проводят с помощью кривых поглощения бета-излучения в алюминии по величине слоя половинного ослабления следующим образом: используя установку с торцевым счётчиком в строго определённых экспериментальных условиях, находят зависимость скорости счёта от толщины слоя d алюминиевого поглотителя, помещаемого между источником и окном счётчика, в непосредственной близости к счётчику. Толщину слоя поглотителя принято выражать массой, приходящейся на единицу поверхности поглощающего слоя, в мг/см^2 . Кривая поглощения, представляющая собой зависимость логарифма скорости счёта $\log_a n$ от толщины d поглотителя, имеет прямолинейный участок. По нему с помощью формулы определяют величину слоя половинного ослабления $d_{1/2}$ в мг/см^2 :

$$d_{1/2} = \frac{\log_a 2}{B},$$

где B – коэффициент при d в формуле $\log_a n = C - Bd$, определяющей прямолинейный участок.

Для определения подлинного значения $d_{1/2}$ для данного радионуклида аналогичные измерения проводят с источником тех же размеров, формы и толщины и примерно той же активности, приготовленным из образцового раствора с этим радионуклидом.

Период полураспада

Для определения периода полураспада измеряют величину активности (или любой пропорциональной ей величины, например, скорости счёта, площади участка спектра и т.д.) в зависимости от времени. Детектор выбирают в зависимости от вида излучения, испускаемого анализируемым нуклидом. Измерения проводят при строго фиксированном расположении

источника относительно детектора излучения, при условии регулярного контроля стабильности показаний применяемой аппаратуры с помощью источника с долгоживущим радионуклидом. Длительность и число измерений определяют для каждого конкретного случая.

Кривая экспоненциального распада (кривая распада) описывается уравнением:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t},$$

где A_t – радиоактивность в момент t ,
 A_0 – радиоактивность в момент $t = 0$,
 λ – константа распада, характерная для каждого радионуклида,
 e – основание натурального логарифма.

Период полураспада ($T_{1/2}$) связан с константой распада (λ) уравнением:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda},$$

где $\ln 2 \sim 0,693$,
 λ – константа распада, характерная для каждого радионуклида.

Измерение активности

Активность радионуклида в препарате (также как и удельную, молярную и объёмную активность) указывают на определённую дату, а для препаратов, содержащих радионуклид с периодом полураспада менее 10 сут, также и на определённое время. Для препаратов, содержащих радионуклид с периодом полураспада менее 1 сут, активность указывают с учётом минут.

Абсолютное измерение активности определённого образца может быть выполнено, если известна схема распада радионуклида, но на практике требуется вносить много корректировок для получения точных результатов. Поэтому обычно проводят измерения с помощью первичного стандартного источника. Первичные стандартные источники не могут быть использованы для короткоживущих радионуклидов, например позитрон-излучателей. Измерительная аппаратура калибруется по доступным стандартам для каждого конкретного радионуклида. Стандарты, которые используют в

лабораториях, тестируются компетентными органами.

Для измерения активности бета- и бета/гамма-излучателей используют ионизационные камеры и счётчики Гейгера-Мюллера; сцинтилляционные и полупроводниковые счётчики или ионизационные камеры используют для измерения активности гамма-излучателей. Для детектирования и измерения активности альфа-излучателей требуются специальное оборудование и методы. Для корректного сравнения радиоактивных источников важно, чтобы исследуемые препараты и стандарты были измерены в одних и тех же условиях.

Активность бета-излучателей с низкой энергией может быть измерена с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика. Образец растворяют в растворе, содержащем одно или несколько (обычно два) органических флюоресцентных вещества (первичный и вторичный сцинтилляторы), превращающих часть энергии распада в фотоны света, которые детектируются фотоумножителем и конвертируются в электрические импульсы. При использовании жидкостных сцинтилляционных счётчиков сравнительные измерения корректируют с учетом эффектов светопоглощения. Прямые измерения выполняют, если это возможно, в одинаковых условиях (например, объём и вид растворов) для определяемого и стандартного источника. Все измерения активности должны быть скорректированы путём вычитания фоновой активности окружающей среды и ложных сигналов, испускаемых самим оборудованием. При измерении большой активности на некотором оборудовании необходимо провести коррекцию на потери от совпадений, возникающие из-за ограниченного времени разрешения детектора и связанного с ним электронного оборудования. Для регистрирующей системы с фиксированным мёртвым временем τ , которое наступает после каждого счёта, уравнение коррекции:

$$A = \frac{A_{abc}}{1 - A_{abc}\tau},$$

где A_{abc} – истинная скорость счёта в секунду,

A – полученная скорость счёта в секунду,

τ – мёртвое время, в секундах.

На некоторых приборах эта корректировка выполняется автоматически. Корректировка из-за потерь от совпадений должна быть выполнена перед корректировкой на фоновое излучение.

Если время индивидуального измерения (t_m) не пренебрежимо мало по сравнению с периодом полураспада ($T_{1/2}$), то должен быть принят во внимание распад в течение времени измерения. После проведения корректировки показаний прибора (скорость счёта, ионизационный ток и т.д.) на фон и, если необходимо, на потери из-за электронных эффектов, проводят коррекцию на распад за время измерения по уравнению:

$$R_{\text{корр}} = \frac{R \frac{t - \ln 2}{T_{1/2}}}{1 - \exp\left(-\frac{t - \ln 2}{T_{1/2}}\right)},$$

где $R_{\text{корр}}$ – показания прибора, скорректированные на начало индивидуального измерения;

R – показание прибора перед корректировкой на распад, но уже после коррекции на фон и т.д.

Результаты определения активности показывают различия, которые, главным образом, связаны с редким видом ядерного превращения.

Для того чтобы компенсировать различия в количестве переходов в единицу времени, должно быть зарегистрировано достаточное количество импульсов. Так, например, необходимо, по крайней мере, 10000 импульсов для получения относительного стандартного отклонения не более 1 % (доверительный интервал: 1 сигма, стандартное отклонение – корень квадратный из числа импульсов).

Все результаты измерения активности приводят с указанием даты и, если необходимо, времени измерения. Это указание должно быть сделано с учётом часового пояса (GMT, CET) (Среднее время по меридиану Гринвича, Центральное Европейское время). Активность на другое время рассчитывают

по экспоненциальному уравнению или определяют по таблицам.

Определение радионуклидной чистоты и радионуклидных примесей

В большинстве случаев для определения радионуклидной чистоты и/или радионуклидных примесей РФЛП предварительно устанавливают подлинность каждого присутствующего радионуклида и измеряют их активность. Для определения радионуклидной чистоты часто используют гамма-спектрометрию. Однако, это не совсем надёжный метод, так как обычно нелегко детектировать альфа- и бета-излучатели, и при использовании детекторов NaI-Tl на пики, характерные для примесей, испускающих гамма-кванты, часто накладывается спектр основного радионуклида.

Требуемая радионуклидная чистота (например, спектр гамма-квантов незначительно отличается от спектра стандартизованного препарата) регламентируется в фармакопейной статье или нормативной документации производителя РФЛП, также могут быть установлены пределы для специфических примесей радионуклидов (например, кобальт-60 в кобальте-57). Хотя эти требования необходимы, они сами по себе недостаточны для подтверждения того, что радионуклидная чистота достаточна для использования этого РФЛП для пациентов. Производитель должен исследовать продукт детально на присутствие долгоживущих примесей через определенное количество периодов полураспада. Особенно это касается анализа РФЛП, содержащих короткоживущий радионуклид. Если необходимо идентифицировать и/или дифференцировать два или более позитрон-излучающих радионуклида, таких как, например, примеси фтора-18 в препаратах азота-13, дополнительно к гамма-спектрометрии проводят определение периода полураспада. Из-за различия периодов полураспада радионуклидов, присутствующих в РФЛП, радионуклидная чистота меняется во времени.

Радионуклидный анализ включает в себя следующие этапы:

обнаружение радионуклидных примесей, их идентификацию (см. раздел «Установление подлинности по радионуклиду») и определение активности. Измерение активности идентифицированных примесей проводят аналогично тому, как описано в разделе «Измерение активности», с помощью подходящих радиометрических установок с бета- и гамма-счетчиками, спектрометров, установок для измерения активности методом совпадений и другой аппаратуры. Конкретные методики анализа на отдельные радионуклидные примеси приводят в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации производителя РФЛП для тех случаев, когда анализ может быть выполнен в течение срока годности препарата.

Активность обнаруженной примеси приводят в процентах по отношению к активности основного радионуклида в препарате на определённую дату.

Радионуклидные примеси, активность которых составляет не более 0,01 % от активности основного радионуклида в течение всего срока годности, в фармакопейной статье или нормативной документации производителя РФЛП не приводят, кроме особых случаев. Указание о пределе суммарной примеси в фармакопейной статье или нормативной документации производителя РФЛП обязательно. В тех случаях, когда примесь не обнаружена, должен быть указан нижний предел обнаружения применённым методом анализа.

Контроль препарата на содержание радионуклидных примесей не выполняют, если:

- в документе на радиоактивное исходное сырьё, применяемое для получения препарата, указано содержание радионуклидных примесей;
- радионуклид является ультра-короткоживущим или короткоживущим, то определение его радионуклидной чистоты затруднено, и его испытание проводится на стадии производства.

Определение радиохимической чистоты и радиохимических примесей

Определение радиохимической чистоты требует разделения различных химических соединений, содержащих радионуклид, и расчёта процента активности, связанной с основной химической формой. Радиохимические примеси могут образовываться в результате:

- производства радионуклида;
- последующих химических операций;
- неполного препаративного разделения;
- химических изменений в результате хранения.

Требование к радиохимической чистоте должно выполняться в течение всего периода хранения. Для определения радиохимической чистоты, в принципе, могут быть использованы различные методы физико-химического анализа: бумажная, тонкослойная, газовая, высокоэффективная жидкостная хроматография, электрофорез и др. Следует указывать меры предосторожности, связанные с использованием радиоактивности, и обеспечивающие радиационную безопасность выполнения определения.

Наиболее часто используются тонкослойная и бумажная хроматография. В бумажной и тонкослойной хроматографии пробу, объём которой указан в фармакопейной статье или нормативной документации производителя РФЛП, наносят на стартовую линию, как описывается в общих методах хроматографии. Важно предотвратить нанесение такого количества активности, которое обусловит потери при измерении за счёт совпадений, возникающих при измерении активности. Используют такое количество препарата, чтобы можно было получить статистически достоверные результаты измерения для тех примесей, активность которых составит не менее 0,5 % от нанесённого количества. Одновременно активность анализируемой пробы должна быть такой, чтобы поправка на просчёты, обусловленная мёртвым временем регистрирующей установки, не превышала 1-2 %. При измерении, в случае необходимости, в пробу может быть добавлен носитель. При этом массы разделяемых веществ не должны

превышать допустимые для указанных методов.

После разделения хроматограмму высушивают, и положение зон радиоактивности определяют автордиографией или путём измерения активности по длине хроматограммы с помощью соответствующих коллимированных счётчиков, или путём разрезания полоски и измерения активности каждого участка полоски (соотношения измеренной активности определяют соотношения концентраций радиоактивных химических форм). Положение пятен и участков можно химически идентифицировать путём сравнения с соответствующими растворами такого же химического вещества (нерадиоактивного), используя соответствующий метод детектирования. Активность может быть измерена путём интегрирования с использованием сканеров или цифровых счетчиков. В показателе радиохимической чистоты приводятся нормативы содержания специфических примесей, включая изомеры. Для оценки эффективности радиофармацевтических лекарственных препаратов промышленного производства при необходимости используется такой показатель качества как физиологическое распределение в тканях организма, определяемый в тестах *in vivo* (на животных).

Удельная активность

Удельную активность обычно рассчитывают, исходя из объёмной активности и концентрации изучаемого химического соединения после подтверждения, что активность относится только к радионуклиду (радионуклидная чистота) и интересующим химическим формам (радиохимическая чистота). Удельная активность изменяется во времени. Поэтому величину удельной активности приводят с указанием даты и, если необходимо, времени. Удельную активность необходимо измерять в препаратах с добавленным носителем. Для некоторых радиофармацевтических лекарственных препаратов без добавления носителя (например, лиганды рецепторов), важно указывать удельную радиоактивность. Фармакопейная статья или нормативная документация производителя РФЛП должны включать пределы удельной радиоактивности.

Действующие и вспомогательные вещества

Для установления подлинности и количественного определения действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав радиофармацевтического лекарственного препарата, можно использовать любые пригодные методы физико-химического анализа. Однако, принимая во внимание требования радиационной безопасности, а также небольшое количество фасовок РФЛП в серии, следует учитывать необходимость минимизации проб испытуемого препарата, как по объёму, так и по массе. Кроме того, предпочтительно должны быть выбраны методы экспресс-анализа с использованием дистанционно управляемого оборудования. Для выполнения анализов препарата при отсутствии отечественных реактивов и материалов допускается использование импортных реактивов и материалов соответствующей квалификации.

В исключительных случаях из-за невозможности количественного определения какого-либо вещества в составе РФЛП современными методами с учетом выше изложенных требований определение не проводят.

Химические примеси

Определение примесей и установление их допустимых пределов проводят в соответствии с требованиями ОФС, предназначенных для проведения испытаний на чистоту и допустимые пределы примесей. Допустимое содержание примесей в растворах РФЛП строго нормировано, так как уровень концентрации радионуклида в препарате без добавления носителя составляет около $10^{-7} - 10^{-8}$ моль/л, и примеси могут конкурентно связываться с химическими веществами, входящими в состав препарата, что приводит к изменению его радиохимической чистоты и, соответственно, фармакокинетики. Поэтому для определения примесей следует использовать высокочувствительные методы физико-химического анализа, такие как атомно-эмиссионная и атомно-абсорбционная пламенная спектрометрия или спектрометрия индуктивно-связанной плазмы в сочетании с масс-спектроскопией.

Обязательно следует проводить определение примесей свинца, железа, мышьяка и металлов, присутствующих в конструкционных материалах мишеней и/или радионуклидных генераторах, а также в исходных реагентах (нерадиоактивном сырье) в процессе разработки и валидации производственного процесса и осуществлять дополнительный контроль в случае изменения конструкционных материалов мишени, генераторного устройства и замены реагентов. Особое внимание необходимо уделять фармакологически активным примесям или примесям, даже в очень малых количествах влияющим на фармакодинамику (например, лиганды рецепторов). В случае необходимости следует определять стереоизомерную чистоту. По возможности, следует указывать подробную характеристику примесей. Общие пределы содержания могут быть установлены для неидентифицированных примесей. Пределы должны быть тщательно подобраны с учетом количества и токсичности, на основании токсичности исходных материалов, предшественников, возможных продуктов распада и конечного продукта.

Сtereoизомерная чистота

При необходимости должна быть указана стереоизомерная чистота.

Определение pH

Определение pH раствора препарата или лиофилизата следует проводить в соответствии с ОФС «Ионометрия».

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ (БИОЛОГИЧЕСКОЕ) РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

При необходимости для некоторых РФЛП могут быть предписаны биологические испытания. Распределение активности, наблюдаемое в указанных органах, тканях и других частях тела у соответствующих видов животных (обычно крысы или мыши), должно реально отражать ожидаемое распределение у человека и таким образом подтвердить функциональную пригодность препарата. Виды испытаний и требования к биологическому распределению РФЛП приводят в соответствующих фармакопейных статьях

или нормативной документации производителя РФЛП. Биологическое распределение, соответствующее требованиям, обеспечит накопление радиоактивных соединений в интересующем биологическом органе человека и пределы его накопления по отношению к окружающим органам и системам.

Стерильность

РФЛП для парентерального введения должны быть приготовлены с соблюдением мер предосторожности, чтобы исключить микробное загрязнение и обеспечить стерильность. Испытание на стерильность выполняют в соответствии с ОФС «Стерильность». Однако, из-за короткого периода полураспада радионуклидов, входящих в состав большинства РФЛП, результат анализа на стерильность получают, как правило, после использования конкретной партии. В таких случаях в фармакопейных статьях или нормативной документации приводят указание о том, что результат контроля стерильности может быть получен после использования препарата.

Часто по нормативам радиационной безопасности (высокий уровень радиоактивности) для испытания на стерильность невозможно использовать РФЛП в количествах, указанных в ОФС «Стерильность». Кроме того, когда объём партии РФЛП ограничен одним или несколькими образцами (например, терапевтические или ультра-короткоживущие препараты), то тест на стерильность оказывается невыполнимым. Если период полураспада очень короткий (например, ≤ 20 мин), введение препарата пациенту проводят в потоке с применением метода мембранной фильтрации и валидацией системы производства.

Как правило, для РФЛП контроль соблюдения условий стерилизации должен гарантировать стерильность препарата, а испытание на стерильность предусматривает проверку каждой десятой партии препаратов, стерилизуемых автоклавированием, или в сухожаровом шкафу (при условии валидации процесса стерилизации).

Для препаратов, стерилизованных фильтрованием и/или изготовленных в асептических условиях, следует проводить испытания стерильности каждой десятой партии при условии валидации асептических зон и контроля целостности стерилизующего фильтра при производстве каждой партии. При проведении испытаний на «стерильность», образцы должны храниться в надлежащих условиях, обеспечивающих достоверность полученных результатов.

Бактериальные эндотоксины или пирогенность

Испытание на «Бактериальные эндотоксины» является более предпочтительным для РФЛП из-за большей чувствительности и скорости проведения. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» с соблюдением необходимых предосторожностей в целях ограничения облучения персонала, проводящего тест.

В разделе «Бактериальные эндотоксины» указывают предельное содержание бактериальных эндотоксинов в расчете на максимальную дозу препарата в миллилитрах с учётом способа его введения. Для препаратов, приготовляемых из лиофилизатов и растворов (элюатов), расчёт значений предельного содержания бактериальных эндотоксинов каждого из компонентов (лиофилизатов или растворов) проводят с учётом величины предельного содержания бактериальных эндотоксинов в готовой лекарственной форме: для препаратов, вводимых внутривенно, предельное содержание бактериальных эндотоксинов рассчитывают по формуле $175 \text{ ЕЭ}/V$, где V – максимальная доза препарата в мл в конце срока годности (наибольшая по объёму доза препарата с наименьшей объёмной активностью). Расчёты необходимо проводить с использованием данных об изменении величины объёмной активности препарата в процессе хранения РФЛП, указанных в соответствующих фармакопейных статьях или нормативной документации производителя РФЛП, и данных инструкции по медицинскому применению о максимальной дозе, вводимой пациенту.

Если точное определение максимально вводимого объёма не

представляется возможным (так как для РФЛП показателем дозы является вводимая активность), целесообразно за V принимать максимальный объём, используемый для введения пациенту РФЛП, равный 10 мл. Полученное значение выражают в ЕЭ на мг сухого вещества, мл раствора или на флакон.

Кроме расчётов должна быть проведена экспериментальная апробация выбранных величин в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины», раздел «Мешающие факторы».

Приводят подробное обоснование, а также результаты экспериментального подтверждения правильности выбранного значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов в РФЛП в виде конкретной инъекционной лекарственной формы или ее компонентах.

Для РФЛП, пирогенность которых может быть обусловлена не только бактериальными эндотоксинами, но и природой испытуемого материала, проводят испытание на пирогенность. В разделе «Пирогенность» указывают, что препарат должен быть апиrogenным. Количество вводимого препарата приводят в миллилитрах на 1 кг массы животного.

Если природа РФЛП обуславливает ингибирование или активирование процесса гелеобразования (при определении бактериальных эндотоксинов) и невозможно ликвидировать мешающий фактор (факторы), проводят испытание на пирогенность в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Испытание РФЛП, поставляемых в клинические учреждения в готовой для использования форме, на бактериальные эндотоксины или пирогенность предусматривает проверку каждой десятой партии препаратов.

Срок годности

Срок годности радиофармацевтических лекарственных препаратов определяется совокупностью следующих факторов:

- стабильностью химического и радиохимического состава РФЛП;
- уменьшением активности радионуклида с течением времени по закону радиоактивного распада;
- возрастанием относительного содержания долгоживущих

радионуклидных примесей, имеющих периоды полураспада большие, чем основной радионуклид.

Срок годности каждого РФЛП приводят в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации и устанавливают в соответствии с ОФС «Сроки годности лекарственных средств». Периодичность контроля РФЛП в зависимости от их срока годности представлена в табл. 1.

Таблица 1 – Периодичность контроля РФЛП при установлении их срока годности

№ п/п	Срок годности	Периодичность проверки качества
1	До 40 мин включительно	На время изготовления
2	Свыше 40 мин до 5 сут включительно	На время изготовления и конец срока годности
3	Свыше 5 сут до 10 сут включительно	На дату изготовления и конец срока годности
4	Свыше 10 сут	На дату изготовления, в середине и в конце срока годности

Для препаратов со сроками годности, указанными в п.п. 3 и 4, приводят еще один раз данные анализа за их пределами. Временной интервал со времени окончания срока годности до даты данного анализа составляет 10-50 % срока годности.

Хранение

Условия хранения должны обеспечивать снижение мощности дозы излучения до допустимого уровня.

В фармакопейной статье или нормативной документации указывают конкретные условия хранения препарата, обусловленные его специфическими свойствами и обеспечивающие сохранность его качества (температурный режим и т.д.).

Радиофармацевтические лекарственные препараты должны быть тщательно закрыты и храниться в зоне, предназначенной для данных целей.

Во время хранения материал первичной упаковки может менять

окраску в результате облучения. Изменение окраски не означает ухудшение качества препарата.

Транспортирование

Транспортирование РФЛП выполняется в соответствии с действующими правилами безопасности при транспортировании радиоактивных веществ.

Упаковка и маркировка

Упаковка и маркировка РФЛП должны производиться в соответствии с действующим законодательством РФ в этой области в отношении радиоактивных препаратов медицинского назначения. При этом необходимо учитывать, что исчерпывающая информация о препарате должна содержаться в паспорте и инструкции по медицинскому применению РФЛП.

Маркировка первичной упаковки РФЛП (как правило, флакон для лекарственных средств) должна содержать минимум информации в целях обеспечения минимальной лучевой нагрузки на глаза медперсонала.

На этикетке первичной упаковки (флакона) со знаком радиационной опасности указывают: название препарата, лекарственную форму, активность (для капсул или драже активность каждой единицы) на установленную дату (и время), номер серии, срок годности.

На этикетке вторичной упаковки (комплект упаковочный транспортный) со знаком радиационной опасности указывают: наименование производителя; его товарный знак (при его наличии); название препарата; МНН на русском языке (если оно имеется); лекарственную форму, состав; «стерильно» (только для инъекционных лекарственных форм); информацию о том, что препарат предназначен для диагностики или для терапевтического применения; пути введения; общая радиоактивность на указанную дату и, при необходимости, время; для растворов предоставляются данные о радиоактивности в надлежащем объеме (например, в МБк на мл раствора); для растворов указывается общий объем; любые специальные требования к

хранению в отношении температуры и освещенности; при необходимости указывается наименование и концентрация антимикробных консервантов; для капсул (драже) дополнительно указывают активность каждой единицы и количество капсул (драже) в упаковке.

Меры предосторожности

Все процедуры с РФЛП выполняются в соответствии с действующими нормативными документами, регламентирующими правила работы с радиоактивными веществами, включая их хранение и транспортировку.

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

ТАБЛИЦА ОСНОВНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАДИОНУКЛИДОВ

Обозначения:

e_{α}	=	электроны Оже
ce	=	электроны конверсии
β^{-}	=	электроны
β^{+}	=	позитроны
γ	=	гамма-излучение
X	=	рентгеновское излучение

Радионуклид	Период полураспада	Тип	Электронная эмиссия		Фотонная эмиссия		
			Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
(I) Средняя энергия β-спектра							
(II) Максимальная вероятность, соответствующая полной аннигиляции в источнике на 100 распадов.							
Тритий (³ H)	12.33 (6) лет	β	0.006 ^m (макс: 0.019)	100			
Углерод-11 (¹¹ C)	20.385 (20) мин	β	0.386 ^m (макс: 0.960)	99.8	γ	0.511	199.5 ^m
Азот-13 (¹³ N)	9.965 (4) мин	β	0.492 ^m (макс: 1.198)	99.8	γ	0.511	199.6 ^m
Кислород-15 (¹⁵ O)	122.24 (16) с	β	0.735 ^m (макс: 1.732)	99.9	γ	0.511	199.8 ^m
Фтор-18 (¹⁸ F)	109.77 (5)мин	β	0.250 ^m (макс: 0.633)	96.7	γ	0.511	193.5 ^m
Фосфор-32 (³² P)	14.26 (4) сут	β	0.695 ^m (макс: 1.71)	100			
Фосфор-33 (³³ P)	25.34 (12) сут	β	0.076 ^m (макс: 0.249)	100			
Сера-35 (³⁵ S)	87.51 (12) сут	β	0.049 ^m (макс: 0.167)	100			
Хром-51 (⁵¹ Cr)	27.7025 (24) сут	e.	0.004	67	X	0.005	22.3
					γ	0.320	9.9
Кобальт-56 (⁵⁶ Co)	77.27 (3) сут	e.	0.006	47	X	0.006-0.007	25
		β	0.179 ^m	0.9	γ	0.511	38.0 ^m
			0.631 ^m	18.1		0.847	100.0
						1.038	14.1
						1.175	2.2
						1.238	66.1
						1.360	4.3
						1.771	15.5
						2.015	3.0
						2.035	7.8
						2.598	17.0
						3.202	3.1
						3.253	7.6
Кобальт-57 (⁵⁷ Co)	271.79 (9) сут	e,+ce	0.006-0.007	177.4	X	0.006-0.007	57
		ce	0.014	7.4	γ	0.014	9.2
			0.115	1.8		0.122	85.6
			0.129	1.3		0.136	10.7
						0.692	0.15

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
Кобальт-58 (⁵⁸ Co)	70.86 (7) сут	е ₊	0.006	49.4	X	0.006-0.007	26.3
		β ⁻	0.201 ¹⁰	14.9	γ	0.511	29.9 ¹⁰
						0.811	99.4
						0.864	0.7
Кобальт-60 (⁶⁰ Co)	5.2714 (5) лет					1.675	0.5
		β ⁻	0.096 ¹⁰ (макс: 0.318)	99.9	γ	1.173	100.0
Медь-62 (⁶² Cu)	9.67 мин					1.333	100.0
		β ⁻	1.316 (макс: 2.926)	97.2	X	0.007	0.709
		е ₊	0.007	1.138			
					γ	0.511	194.86
						0.875	0.15
Медь-64 (⁶⁴ Cu)	12.7 час					1.173	0.342
		β ⁻	0.278 (макс: 0.653)	17.4	X	0.007	14.12
		β ⁻	0.190 (макс: 0.579)	39.0		0.008	1.91
		е ₊	0.007	22.66			
					γ	0.511	34.79
Галлий-66 (⁶⁶ Ga)	9.49 (7) час					1.345	0.473
		е ₊	0.008	21	X	0.009-0.010	19.1
		β ⁻	0.157 ¹⁰	1	γ	0.511	112 ¹⁰
			0.331 ¹⁰	0.7		0.834	5.9
			0.397 ¹⁰	3.8		1.039	37
			0.782 ¹⁰	0.3		1.333	1.2
			1.90 ¹⁰	50		1.919	2.1
						2.190	5.6
						2.423	1.9
						2.752	23.4
						3.229	1.5
						3.381	1.5
						3.792	1.1
						4.086	1.3
						4.295	4.1
Галлий-67 (⁶⁷ Ga)	3.2612 (6) сут					4.807	1.8
		е ₊	0.008	62	X	0.008-0.010	57
		се	0.082-0.084	30.4	γ	0.091-0.093	42.4
			0.090-0.092	3.6		0.185	21.2
			0.175	0.3		0.209	2.4
						0.300	16.8
						0.394	4.7
Германий-68 (⁶⁸ Ge) в равновесии с	270.82 (27) сут					0.888	0.15
		е ₊	0.008	42.4	X	0.009-0.010	44.1

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
галлий-68 (^{68}Ga)	^{68}Ga : 67.629 (24) мин	β^-	0.353 ¹⁰	1.2	γ	0.511	178.3
			0.836 ¹⁰	88.0		1.077	3.0
Галлий-68 (^{68}Ga)	67.629 (24) мин	e_+	0.008	5.1	X	0.009-0.010	4.7
		β^-	0.353 ¹⁰	1.2	γ	0.511	178.3
			0.836 ¹⁰	88.0		1.077	3.0
Криптон-81m (^{81m}Kr)	13.10 (3) с	се	0.176	26.4	X	0.012-0.014	17.0
			0.189	4.6			
					γ	0.190	67.6
Рубидий-81 (^{81}Rb) в равновесии с Криптоном-81m (^{81m}Kr)	4.576 (5) час	e_+	0.011	31.3	X	0.013-0.014	57.2
		се	0.176	25.0	γ	0.190	64
			0.188	4.3		0.446	23.2
						0.457	3.0
		^{81m}Kr : 13.10 (3) с	β^-	0.253 ¹⁰		0.510	5.3
			0.447 ¹⁰	25.0		0.511	54.2
						0.538	2.2
Рубидий-82 (^{82}Rb)	1.3 мин	β^-	1.523	83.3	γ	0.511	191
Стронций-82 (^{82}Sr)	25 сут	e	0.00017	202	X	0.002-0.013	60
Стронций-85 (^{85}Sr)	64.84 сут	e	0.017	204	X	0.013	50
		се	0.51	0.066	X	0.013-0.015	55
Стронций-89 (^{89}Sr) в равновесии с Иттрием-89m (^{89m}Y)	50.53 (7) сут				γ	0.514	99.3
		β^-	0.583 ¹⁰ (макс: 1.492)	99.99	γ	0.909	0.01
Стронций-90 (^{90}Sr) в равновесии с Иттрием-90 (^{90}Y)	28.74 (4) лет	β^-	0.196 ¹⁰ (макс: 0.546)	100			
Иттрий-90 (^{90}Y)	64.10 (8) час	β^-	0.934 ¹⁰ (макс: 2.280)	100			
Молибден-99 (^{99}Mo) в равновесии с Технецием-99m (^{99m}Tc)	65.94 (1) час	β^-	0.133 ¹⁰	16.4	X	0.018-0.021	3.6
			0.290 ¹⁰	1.1			
			0.443 ¹⁰	82.4	γ	0.041	1.1
						0.141	4.5
						0.181	6
						0.366	1.2
		^{99m}Tc : 6.01 (1) час				0.740	12.1
						0.778	4.3

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
Технеций-99m (^{99m}Tc)	6.01 (1) час	се	0.002	74	X	0.018-0.021	7.3
		e_+	0.015	2.1	γ	0.141	89.1
		се	0.120	9.4			
Технеций-99 (^{99}Tc)	2.11×10^5 лет	β^-	0.085 ^ю (макс: 0.294)	100			
Рутений-103 (^{103}Ru) в равновесии с Родием-103m (^{103m}Rh)	39.26 (2) сут	e_+ се	0.017	12	X	0.020-0.023	9.0
		се	0.030-0.039	88.3	γ	0.497	91
		β^-	0.031 ^ю	6.6		0.610	5.8
			0.064 ^ю	92.2			
Индий-110 (^{110}In)	4.9 (1) час	e_+	0.019	13.4	X	0.023-0.026	70.5
					γ	0.642	25.9
						0.658	98.3
						0.885	92.9
						0.938	68.4
						0.997	10.5
Индий-110m (^{110m}In)	69.1 (5) мин	e_+	0.019	5.3	X	0.023-0.026	27.8
		β^-	1.015 ^ю	61	γ	0.511	123.4 ^ю
						0.658	97.8
						2.129	2.1
Индий-111 (^{111}In)	2.8047 (5) сут	e_+	0.019	15.6	X	0.003	6.9
						0.023-0.026	82.3
		се	0.145	7.8			
			0.167-0.171	1.3	γ	0.171	90.2
			0.219	4.9		0.245	94.0
			0.241-0.245	1.0			
Индий-114m (^{114m}In) в равновесии с Индием-114 (^{114}In)	49.51 (1) сут	се	0.162	40	X	0.023-0.027	36.3
			0.186-0.190	40			
					γ	0.190	15.6
		β^-	0.777 ^ю (макс: 1.985)	95		0.558	3.2
		(^{114}In : 71.9 (1) с)				0.725	3.2
Теллур-121m (^{121m}Te) в равновесии с Теллуrom-121 (^{121}Te)	154.0 (7) сут	e_+	0.003	88.0	X	0.026-0.031	50.5
			0.022-0.023	7.4			
					γ	0.212	81.4
		се	0.050	33.2		1.102	2.5
		(^{121}Te : 19.16	0.077	40.0			

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
Теллур-121 (^{121}Te)	(5) сут						
			0.180	6.1			
	19.16 (5) сут	e_{β}	0.022	11.6	X	0.026-0.030	75.6
					γ	0.470	1.4
Йод-123 (^{123}I)	13.27 (8) час	e_{β}				0.508	17.7
						0.573	80.3
						0.004	9.3
						0.027-0.031	86.6
		ce	0.127	13.6			
			0.154	1.8	γ	0.159	83.3
			0.158	0.4		0.346	0.1
						0.440	0.4
						0.505	0.3
Йод-124 (^{124}I)	4.176 дня	β^{-}	0.687 (макс: 1.534)	11.79	X	0.004	6.3
			0.975 (макс: 2.138)	10.89		0.027	47.5
		e_{β}	0.003	63.0		0.031	10.73
			0.023	8.30			
					γ	0.511	45.96
						0.603	62.9
						0.723	10.35
						1.509	3.13
						1.691	10.88
Йод-125 (^{125}I)	59.402 (14) сут	$e_{\beta}+ce$	0.004	80	X	0.004	15.5
			0.023-0.035	33		0.027	114
						0.031	26
					γ	0.035	6.7
Йод-126 (^{126}I)	13.11 (5) сут	e_{β}	0.023	6	X	0.027-0.031	42.2
		ce	0.354	0.5	γ	0.388	34
			0.634	0.1		0.491	2.9
						0.511	2.3 (m)
		β^{-}	0.109 (m)	3.6		0.666	33
			0.290 (m)	32.1		0.754	4.2
			0.459 (m)	8.0		0.880	0.8
						1.420	0.3
		β^{-}	0.530 (m)	1			
Йод-131 (^{131}I)	8.02070 (11) сут	ce	0.46	3.5	X	0.029-0.030	3.9
			0.330	1.6			
					γ	0.080	2.6

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
		β^-	0.069 ¹⁰	2.1		0.284	6.1
			0.097 ¹⁰	7.3		0.365	81.7
			0.192 ¹⁰	89.9		0.637	7.2
						0.723	1.8
Ксенон-131m (^{131m} Xe)	11.84 (7) сут	e_+	0.025	6.8	X	0.004	8.3
						0.030	44.0
		e_-	0.129	61		0.034	10.2
			0.159	28.5			
			0.163	8.3	γ	0.164	2.0
Йод-133 (¹³³ I) (распадается до Ксенона-133)	20.8 (1) час	β^-	0.140 ¹⁰	3.8	γ	0.530	87
			0.162 ¹⁰	3.2		0.875	4.5
			0.299 ¹⁰	4.2		1.298	2.4
			0.441 ¹⁰	83			
Ксенон-133 (¹³³ Xe)	5.243 (1) сут	e_+	0.026	5.8	X	0.004	6.3
						0.031	40.3
		e_-	0.045	55.1		0.035	9.4
			0.075-0.080	9.9			
					γ	0.080	38.3
Ксенон-133m (^{133m} Xe) (распадается до Ксенона-133)	2.19 (1) сут	β^-	0.101 ¹⁰	99.0			
		e_+	0.025	7	X	0.004	7.8
						0.030	45.9
		e_-	0.199	64.0		0.034	10.6
			0.228	20.7			
Йод-135 (¹³⁵ I) (распадается до Ксенона-135)	6.57 (2) час		0.232	4.6	γ	0.233	10.0
		β^-	0.140 ¹⁰	7.4	γ	0.527	13.8
			0.237 ¹⁰	8		0.547	7.2
			0.307 ¹⁰	8.8		0.837	6.7
			0.352 ¹⁰	21.9		1.039	8.0
			0.399 ¹⁰	8		1.132	22.7
			0.444 ¹⁰	7.5		1.260	28.9
			0.529 ¹⁰	23.8		1.458	8.7
Ксенон-135 (¹³⁵ Xe)	9.14 (2) час					1.678	9.6
						1.791	7.8
		e_-	0.214	5.5	X	0.031-0.035	5.0
Цезий-137 (¹³⁷ Cs) в равновесии с Барием-137m (^{137m} Ba)	30.04 (3) лет	e_+	0.026	0.8	X	0.005	1
						0.032-0.036	7
		e_-	0.624	8.0			
			0.656	1.4	γ	0.662	85.1
		β^-	0.174 ¹⁰	94.4			
			0.416 ¹⁰	5.6			

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
Самарий-153 (^{153}Sm)	46.3 часа	β^-	0.200 (макс: 0.635)	32.2	X	0.006	12.0
			0.226 (макс: 0.705)	49.6		0.041	17.5
			0.265 (макс: 0.808)	17.5		0.042	31.7
		се	0.021	21.7		0.047	12.4
			0.055	43.2			
			0.095	6.44			
					γ	0.070	4.85
Гольмий-166 (^{166}Ho)	26.8 час	β^-	0.651 (макс: 1.773)	48.7	X	0.103	29.8
			0.694 (макс: 1.854)	50.0		0.007	8.3
						0.048	3.1
		e_+	0.006	27.8		0.049	5.5
		се	0.023	11.5			
			0.071	26.5			
			0.078	6.44	γ	0.081	6.71
Лютеций-177 (^{177}Lu)	6.65 дня	β^-	0.048 (макс: 0.177)	11.61	γ	0.208	10.36
			0.110 (макс: 0.385)	9.1			
			0.149 (макс: 0.498)	79.4			
		e_+	0.044	0.27			
		се	0.112	0.48			
			0.143	0.57			
Рений-188 (^{188}Re)	17.0 час	β^-	0.528 (макс: 1.487)	1.748	X	0.009	3.2
			0.729 (макс: 1.965)	26.3		0.063	2.44
			0.795 (макс: 2.120)	70.0			
		e_+	0.007	6.8	γ	0.155	15.61
		се	0.081	5.04			
			0.142	5.85			
Золото-198 (^{198}Au)	2.696 сут	β^-	0.315 (I)	98.7	γ	0.412	95.5
Таллий-199 (^{199}Tl)	7.42 час	се	0.144	1.23	X	0.069-0.080	94.5
			0.193	1.19			
		β^-	0.227	0.1			
					γ	0.158	4.9
						0.208	12.8
						0.247	9.2
						0.334	1.6
						0.455	12.3
Таллий-200 (^{200}Tl)	26.1 (1) час	се	0.285	3.4	X	0.010	32.0
			0.353	1.4		0.069-0.071	63.3
						0.08	17.5
		β^-	0.495 m	0.3			
					γ	0.368	87.2
						0.579	13.8
						0.828	10.8
						1.206	29.9
						1.226	3.4
						1.274	3.3
						1.363	3.4
						1.515	4.0

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
Свинец-201 (^{201}Pb) (распадается до Таллия-201)	9.33 (3) час	e_{β}	0.055	3	X	0.070-0.073	69
						0.083	19
		ce	0.246	8.5			
			0.276	2	γ	0.331	79
			0.316	2.3		0.361	9.9
						0.406	2.0
						0.585	3.6
						0.692	4.3
						0.767	3.2
						0.826	2.4
						0.908	5.7
						0.946	7.9
						1.099	1.8
						1.277	1.6
Таллий-201 (^{201}Tl)	72.912 (17) час	ce	0.016-0.017	17.7	X	0.010	46.0
			0.027-0.029	4.1		0.069-0.071	73.7
			0.052	7.2		0.080	20.4
			0.084	15.4			
			0.153	2.6	γ	0.135	2.6
						0.167	10.0
Таллий-202 (^{202}Tl)	12.23 (2) сут	e_{β}	0.054	2.8	X	0.010	31.0
						0.069-0.071	61.6
		ce	0.357	2.4		0.080	17.1
					γ	0.440	91.4
Свинец-203 (^{203}Pb)	51.873 (9) час	e_{β}	0.055	3.0	X	0.010	37.0
						0.071-0.073	69.6
		ce	0.194	13.3		0.083	19.4
					γ	0.279	80.8
						0.401	3.4
Астат-211 (^{211}At)	7.21 час	α	5.870	41.8	X	0.011	19.7
						0.077	12.68
		e_{β}	0.008	26.1		0.079	21.24
			0.06	1.34		0.090	9.53
					γ	0.687	0.261
Висмут-213 (^{213}Bi)	45.6 мин	α	5.869	1.94	X	0.011	1.75
		β^{-}	0.320 (макс: 0.982)	31.0		0.077	1.18
			0.492 (макс: 1.422)	65.9		0.079	1.98
		e_{β}	0.008	2.31			
		ce	0.347	3.97	γ	0.440	26.1
Радий-226 (^{226}Ra)	11.43 дня	α	5.434	2.22	X	0.012	25
			5.540	9.0		0.081	15.3
			5.607	25.2		0.084	25.4
			5.716	51.6		0.095	11.5

Радионуклид	Период полураспада	Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
		Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)	Тип	Энергия (МэВ)	Вероятность (на 100 распадов)
			5.747	9.0			
		e ₊	0.009	28	γ	0.154	5.7
		ce	0.024	7.5		0.269	13.9
			0.046	12.7			
			0.056	18.5			
			0.171	9.3			

ФЭМБ
Федеральная электронная
медицинская библиотека

