МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XIV издание

Том II

Москва
2018

Лекарственные формы	**ОФС.1.4.1.0001.15**
	Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к производству, изготовлению, показателям и методам оценки качества лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения.

Требования к лекарственным формам для гомеопатических лекарственных препаратов устанавливает общая фармакопейная статья «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

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 лекарственных средств – 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.

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

Способ/путь введения и применения – способ или путь доставки лекарственного средства в организм человека или животного.

Дозировка — содержание одного или нескольких действующих веществ в количественном выражении на единицу дозы, или единицу объема, или единицу массы в соответствии с лекарственной формой, либо для некоторых видов лекарственных форм – количество высвобождаемого из лекарственной формы действующего вещества за единицу времени.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ПЕРЕЧЕНЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Все лекарственные формы могут быть иерархически классифицированы по следующими основным признакам, указанным в таблице: агрегатному состоянию, типу дисперсной системы, способу/пути введения и применения, типу высвобождения.

Таблица – Классификация лекарственных форм

<table>
<tr><th>Уровень</th><th colspan="5">Классификационный признак</th></tr>
<tr><td rowspan="2">1</td><td colspan="5">Лекарственные формы по агрегатному состоянию</td></tr>
<tr><td>твердые</td><td colspan="2">жидкие</td><td>мягкие</td><td>газообразные</td></tr>
<tr><td rowspan="2">2</td><td colspan="5">Лекарственные формы по типу дисперсной системы</td></tr>
<tr><td colspan="3">гомогенные</td><td>гетерогенные</td><td>комбинированные</td></tr>
<tr><td rowspan="2">3</td><td colspan="5">Лекарственные формы по способу/пути введения и применения</td></tr>
<tr><td>для приема внутрь</td><td>для наружного применения</td><td>для местного применения</td><td>для парентерального применения</td><td>для ингаляционного применения</td></tr>
<tr><td rowspan="2">4</td><td colspan="5">Лекарственные формы по типу высвобождения</td></tr>
<tr><td colspan="3">с обычным высвобождением</td><td colspan="2">с модифицированным высвобождением</td></tr>
</table>

К твердым лекарственным формам относят таблетки, капсулы, порошки, гранулы, драже, пастилки, лиофилизаты, имплантаты, карандаши, тампоны, сборы, пленки, сухие экстракты, гранулы резано-прессованные и др.

К жидким лекарственным формам относят растворы, капли, сиропы, суспензии, эмульсии, жидкие экстракты, настойки, эликсиры, шампуни, настои, отвары, соки и др.

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

К газообразным лекарственным формам относят газы медицинские, аэрозоли, спреи и др.

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

Гомогенная дисперсная система – тип дисперсной системы, в которой отсутствует поверхность раздела фаз между дисперсной фазой и дисперсионной средой (истинные растворы, растворы высокомолекулярных соединений, мази-сплавы и др.).

Гетерогенная дисперсная система – тип дисперсной системы, в которой имеется поверхность раздела фаз между дисперсной фазой и дисперсионной средой (суспензии, эмульсии и др.).

Комбинированная дисперсная система – тип дисперсной системы, состоящей как из гомогенных, так и гетерогенных дисперсных систем.

Лекарственные формы по способу/пути введения и применения классифицируют на такие основные группы как: для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения, для парентерального применения, для ингаляционного применения, кроме того, могут быть выделены лекарственные формы для трансдермального применения. Каждая из указанных групп, при необходимости, может иметь подгруппы.

Лекарственные формы могут быть предназначены для оказания местного и/или системного действия на организм человека.

По типу высвобождения лекарственные формы могут иметь обычное и модифицированное высвобождение. Модифицированное (нестандартное) высвобождение может быть замедленным непрерывным (пролонгированным), прерывистым (пульсирующим), отсроченным и ускоренным.

По готовности к применению выделяют группу лекарственных форм,

требующих перед применением дополнительного преобразования путем растворения или диспергирования в соответствующем растворителе, с целью приготовления восстановленных или разведенных лекарственных форм, предназначенных для непосредственного применения/введения.

Лекарственные формы могут быть дозированными или недозированными. Дозированными называют лекарственные формы, содержащие одну дозу действующего вещества в каждой единице продукции.

Лекарственные формы могут быть выпущены в однодозовой упаковке, содержащей одну дозу действующего вещества, или в многодозовой упаковке, содержащей несколько доз действующего вещества.

Лекарственный препарат в различных лекарственных формах может включать одно, два и более действующих веществ (фармацевтических субстанций) и может не содержать вспомогательных веществ или, как правило, содержать одно или более вспомогательных веществ или основу, представляющую собой носитель для действующего вещества (веществ) (например, в мягких лекарственных формах), состоящую из одного или более вспомогательных веществ.

Различают лекарственные формы лекарственных препаратов, содержащих действующие вещества растительного происхождения: настойки, экстракты, эликсиры, настои, отвары, соки, сборы, гранулы резано-прессованные, которые в ряде случаев могут быть позиционированы и использованы как фармацевтические субстанции (экстракты в капсулах, таблетках и т.д.).

Классификационные признаки должны быть учтены при составлении наименования лекарственной формы лекарственного препарата для медицинского применения.

Под «наименованием лекарственной формы» понимают слово или словосочетание, выражающее единичное понятие о лекарственной форме и отличающее ее от других лекарственных форм.

Основным элементом наименования лекарственной формы является общий термин, обозначающий самостоятельную, относительно однородную группу лекарственных форм. Наименование основного элемента лекарственной формы лекарственного препарата для медицинского применения должно соответствовать определению, указанному в соответствующей общей фармакопейной статье (ОФС) (например, в ОФС «Таблетки», ОФС «Суспензии», ОФС «Настойки» и т.д.).

Дополнительным элементом названия лекарственной формы является слово или словосочетание, которое отражает такие классификационные признаки, как способ/путь введения или применения, тип модифицированного высвобождения, в установленных случаях – признак готовности к применению, технологические признаки (например, «таблетки, покрытые оболочкой», «порошок шипучий» и др.), признак разделения на дозы, признак возрастной группы (например, «для детей»), природу растворителя в растворах (например, «спиртовой», «масляный»), характер вкуса и/или аромата (например,«со вкусом лимона», «с ароматом ментола») и др.

Возможные способы/пути введения или применения конкретной лекарственной формы, как правило, указаны в общей фармакопейной статье на данную лекарственную форму.

Если в наименовании таких лекарственных форм как таблетки, гранулы, капли, сиропы, настойки, не указан способ применения, то следует считать, что лекарственные формы предназначены «для приема внутрь».

Под наружным применением понимается нанесение лекарственного препарата на неповрежденную и/или поврежденную кожу, в том числе на раневые и/или ожоговые поверхности, и/или волосы, и/или ногти.

Под местным применением понимается нанесение лекарственного препарата на слизистые оболочки, в том числе глазное, назальное, ректальное, вагинальное применение, нанесение на десны, на слизистую оболочку полости рта и др., а также введение в наружный слуховой проход.

Термин «для местного применения» используют, если лекарственная форма предназначена для трех и более способов/путей введения и применения, относящихся к местному применению; если менее, чем для трех – указывают конкретный способ/путь введения/применения.

Если лекарственная форма для местного применения в полости рта предназначена для трех и более способов применения (например, для нанесения на слизистую оболочку полости рта, для нанесения на зубы, для нанесения на десны и др.), используют термин «стоматологический»; если способов применения один или два, то указывают конкретный способ применения.

Под парентеральным применением понимают введение лекарственного препарата в организм человека с нарушением целостности кожных покровов и/или слизистых оболочек, в том числе путем инъекций, инфузий или имплантации.

Термин «для инъекций» используют, если лекарственная форма предназначена для трех и более инъекционных путей введения (например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного введения и др.).

Термин «для инфузий» используют, если лекарственная форма предназначена, как правило, для медленного, часто капельного введения в больших объемах с помощью инфузионных систем. Данный термин без уточнения пути введения означает «инфузию для внутривенного введения».

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

В зависимости от назначения, способа/пути введения и применения, а также режима дозирования, технологических и других классификационных признаков лекарственной формы, в перечень испытаний для оценки ее качества, включаются испытания, отражающие, при необходимости, особенности данной лекарственной формы.

В зависимости от способа/пути введения отдельные лекарственные формы могут быть также объединены в группы (для парентерального

применения, глазные лекарственные формы, лекарственные формы для ингаляций, ректальные лекарственные формы, вагинальные лекарственные формы и т.д.). Отдельные лекарственные формы могут быть представлены одновременно в различных группах, например, таблетки могут быть для приема внутрь, для парентерального применения, для вагинального применения и т.д. В ряде случаев, лекарственные формы, объединенные в одну группу по способу/пути введения и применения могут иметь общий дополнительный показатель их качества (для парентеральных и глазных лекарственных форм – показатель «Стерильность» и, как правило, «Изотоничность» и т.д.), который отражает специфику применения лекарственной формы той или иной группы.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Производство лекарственных препаратов в различных лекарственных формах должно осуществляться производителями лекарственных средств, имеющими лицензию на производство лекарственных средств, в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики (GMP), утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти. Правила GMP распространяются на все виды лекарственных средств и устанавливают общие требования к организации их производства и контроля качества, а также дополнительные требования к организации производства отдельных видов лекарственных препаратов в различных лекарственных формах.

Изготовление лекарственных препаратов в различных лекарственных формах должно осуществляться аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность, в соответствии с Правилами изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

Вспомогательные вещества, вводимые в состав лекарственных препаратов для обеспечения соответствующих свойств лекарственной формы, должны быть разрешены для медицинского применения.

При разработке составов лекарственных препаратов с антимикробными консервантами в любых лекарственных формах, необходимость использования и эффективность консервантов должны быть подтверждены. Методика определения и критерии эффективности консервантов, входящих в состав лекарственного препарата, должны соответствовать требованиям ОФС «Определение эффективности антимикробных консервантов».

В отдельных случаях, определяемых соответствующими нормативными актами, использование антимикробных консервантов недопустимо, например, в лекарственных препаратах, предназначенных для новорожденных и др. Лекарственные препараты в лекарственных формах, предназначенных для внутриполостных, внутрисердечных, внутриглазных или других инъекций, имеющих доступ к спинномозговой жидкости, а также при разовой дозе, превышающей 15 мл, не должны содержать антимикробные консерванты.

При производстве, изготовлении, упаковке, хранении и транспортировании нестерильных лекарственных препаратов должны быть использованы материалы и методы, предотвращающие загрязнение и рост микроорганизмов и обеспечивающие соответствие их требованиям ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные лекарственные препараты производят и изготавливают с применением материалов и методов, предотвращающих загрязнение и обеспечивающих их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность». Для их получения используют методы и условия стерилизации, указанные в ОФС «Стерилизация».

Лекарственные препараты в отдельных лекарственных формах могут быть выпущены готовыми к применению или могут быть получены непосредственно перед применением дополнительным преобразованием

путем растворения, диспергирования или проведения иных технологических операций в виде восстановленных жидких лекарственных форм из твердых лекарственных форм (таблетки, порошки, гранулы, лиофилизаты, а также сборы и лекарственные растительные препараты и т.д.) или в виде разбавленных лекарственных форм из жидких лекарственных форм (жидкие концентраты, растворы).

ИСПЫТАНИЯ

Оценка качества лекарственных препаратов в различных лекарственных формах включает, как правило, испытания по показателям качества, характеризующим конкретную лекарственную форму или группу лекарственных форм, а также по показателям качества, характеризующим действующее вещество/вещества и, при необходимости, вспомогательное вещество/вещества, входящее в состав данного лекарственного препарата (подлинность, количественное определение, остаточные органические растворители, родственные примеси, тяжелые металлы и др.)

Следующие испытания характеризуют лекарственную форму лекарственного препарата.

Описание. Приводят сведения, которые наиболее полно характеризуют требования, предъявляемые к внешнему виду (агрегатное состояние, форма, размеры и др.) и органолептическим свойствам (цвет, запах) лекарственного препарата в лекарственной форме; описание вкуса приводить не рекомендуется.

Прозрачность. Испытание проводят для жидких лекарственных форм, представленных стерильными растворами, растворами для приема внутрь, растворами для местного применения в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», для остальных жидких лекарственных форм – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации.

Цветность. Испытание проводят для жидких лекарственных форм, представленных стерильными растворами, растворами для приема внутрь,

растворами для местного применения в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей» обязательно, для остальных растворов – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации.

pH. Испытание проводят для жидких лекарственных форм (растворов, суспензий, эмульсий, концентратов, эликсиров, сиропов, соков, пен, шампуней лекарственных и др.), для некоторых мягких лекарственных форм (мази), а также водных, как правило, извлечений из таких лекарственных форм, как пленки биодеградируемые, тампоны лекарственные, губки лекарственные и др. Определение pH проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» и соответствующими указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации**.**

Однородность массы дозированных лекарственных форм. Испытание проводят для дозированных лекарственных форм, включая лекарственные формы в однодозовой индивидуальной упаковке, в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм», если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний.

Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Средняя масса. Определение проводят в ходе выполнения испытания «Однородность массы дозированных лекарственных форм» для дозированных лекарственных форм, включая лекарственные формы в однодозовой индивидуальной упаковке, или как самостоятельное испытание, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Показатели «Средняя масса» и «Отклонения от средней массы» определяют в соответствии с методикой и нормативными значениями, приведенными в ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм», если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний.

Данные показателя «Средняя масса» могут быть необходимы для расчетов, например, при количественном определении и др.

Однородность дозирования. Испытание проводят для дозированных лекарственных форм, включая лекарственные формы в однодозовой индивидуальной упаковке, в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования», если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний.

Для дозированных аэрозолей и спреев показатель «Однородность массы дозы» определяют в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи»; для дозированных лекарственных форм для ингаляций показатель «Однородность доставляемой дозы (однородность дозирования)» определяют в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для ингаляций»; для капель, предназначенных для приема внутрь, определяют показатель «Доза и однородность дозирования» в соответствии с требованиями ОФС «Капли».

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных лекарственных форм, за исключением жидких лекарственных форм для парентерального применения. Испытания также не применяют для жидких лекарственных форм для приема внутрь, за исключением таких лекарственных форм, как капли, сиропы, эликсиры, настойки, экстракты жидкие, соки. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки», если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний.

Для недозированных аэрозолей, спреев, пен проводят испытание по показателю «Выход содержимого упаковки» в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи».

Извлекаемый объем. Испытание проводят для жидких лекарственных форм для приема внутрь, за исключением таких лекарственных форм, как капли, сиропы, эликсиры, настойки, экстракты жидкие, соки, в соответствии с требованиями ОФС Извлекаемый объем».

Испытания не проводят для лекарственных форм в однодозовых упаковках, если в фармакопейную статью или нормативную документацию включено испытание на однородность дозирования.

Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения. Испытание проводят для жидких лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Распадаемость. Испытание проводят, как правило, для твердых дозированных лекарственных форм. Для таблеток и капсул, а также, если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний, для гранул, драже, пастилок, пилюль, испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Для суппозиториев и вагинальных таблеток испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость суппозиториев и вагинальных таблеток». Испытание для пленок проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на конкретный лекарственный препарат.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Время растворения. Испытание проводят для твердых лекарственных форм (порошков, гранул, лиофилизатов, таблеток), предназначенных для получения восстановленных лекарственных форм, для шипучих лекарственных форм (таблеток, гранул, порошков) в соответствии с ОФС «Время растворения», если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний.

Растворение. Испытание проводят, как правило, для твердых и некоторых мягких лекарственных форм. Для таблеток, капсул, гранул, а также, если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний, для пленок, испытание проводят в соответствии с

требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Для суппозиториев на липофильной основе испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для суппозиториев на липофильной основе»; для трансдермальных пластырей – в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для трансдермальных пластырей»; для резинок жевательных лекарственных – в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для жевательных лекарственных резинок»; для имплантатов и систем терапевтических – в соответствии с указаниями фармакопейной статьи или нормативной документации на конкретный лекарственный препарат.

Размер частиц. Испытание проводят для лекарственных форм, содержащих частицы действующих и вспомогательных веществ, размер которых может оказать неблагоприятное воздействие на безопасность и эффективность лекарственного препарата.

Для ингаляционных аэрозолей определяют респирабельную фракцию (частиц с размером приблизительно от 1 до 5 мкм) в соответствии с ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц». Для порошков, сухих экстрактов испытание проводят, как правило, в соответствии с ОФС «Ситовой анализ». Для суспензий, эмульсий для внутрисосудистого введения, а также лекарственных форм суспензионного или комбинированного типа (неингаляционные аэрозоли и спреи, мази, суппозитории, пены) испытание проводят, как правило, методом оптической микроскопии в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. В установленных случаях определение размера частиц проводят методом лазерной дифракции в соответствии с ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света».

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят, как правило, для твердых, иногда мягких, лекарственных форм (порошки, гранулы, таблетки, полученные лиофилизацией, лиофилизаты, имплантаты,

пленки, драже, плитки, пастилки, резинки жевательные лекарственные, экстракты сухие и густые и др.) в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации в тех случаях, когда содержание воды может влиять на физико-химические свойства лекарственной формы, биодоступность действующего вещества (веществ), на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме и т.д. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение воды» или ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Показатели «Потеря в массе при высушивании» и «Вода» могут быть альтернативными, кроме случаев, когда определение потери в массе при высушивании необходимо для контроля содержания остаточных органических растворителей.

Сухой остаток. Испытание проводят для жидких лекарственных форм лекарственных препаратов, содержащих действующие вещества растительного происхождения (настойки, жидкие экстракты. соки, настои, отвары) в соответствии с требованиями, указанными в общей фармакопейной статье на лекарственную форму или фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят для жидких лекарственных форм, представляющих собой спиртовые растворы, содержащие спирт этиловый в концентрации выше 40 %, а также другие неводные растворы, для настоек, масляных экстрактов, эликсиров, сиропов, соков, концентратов, шампуней лекарственных и др. в соответствии с ОФС «Плотность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вязкость. Испытание проводят для жидких лекарственных форм (растворов высокомолекулярных соединений, суспензий, эмульсий, шампуней лекарственных и др.) в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Механические включения. Лекарственные формы для

парентерального применения и глазные лекарственные формы должны выдерживать требования по содержанию видимых механических включений в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Лекарственные формы для парентерального применения должны выдерживать требования по содержанию невидимых механических включений в соответствии с требованиями ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Дозированные аэрозоли для ингаляций и дозированные порошки для ингаляций должны выдерживать требования по содержанию механических включений в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для ингаляций» и методикой, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Осмоляльность. Испытание проводят для растворов для инфузий в соответствии с ОФС «Осмолярность», в случае, если теоретическая осмолярность не может быть рассчитана.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят для всех нестерильных лекарственных препаратов в соответствии требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» с учетом свойств действующего вещества (веществ) лекарственного препарата и вида лекарственной формы с ее классификационными признаками.

Стерильность. Испытание проводят для всех лекарственных препаратов, к которым предъявляется требование стерильности, в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины и/или Пирогенность. Испытание проводят для всех лекарственных форм для парентерального применения, растворов для орошения и, при указании в фармакопейной статье или нормативной документации, для других лекарственных форм. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные

эндотоксины» или ОФС «Пирогенность».

Кроме того, для оценки качества лекарственной формы могут быть необходимы испытания, предназначенные для конкретного наименования лекарственной формы, например, испытание **«Проходимость через иглу»** для суспензий для парентерального применения, испытание **«Седиментационная устойчивость»** для суспензий и шампуней лекарственных суспензионного и комбинированного типа, испытания **«Относительная плотность пены»** и **«Время пенообразования»** для пен и другие испытания.

Для ряда лекарственных форм выделяют испытания, которые проводят в рамках контроля технологического процесса производства лекарственных препаратов в данной лекарственной форме.

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

Истираемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Истираемость таблеток» в рамках контроля технологического процесса производства таблеток.

Пенообразующая способность. Испытание допускается проводить в рамках контроля технологического процесса производства шампуней лекарственных в соответствии с требованиями ОФС «Шампуни лекарственные».

Сыпучесть. Угол естественного откоса. Насыпной объем. Испытание по одному или нескольким критериям допускается проводить в рамках контроля технологического процесса производства порошков и сухих экстрактов в соответствии с ОФС «Степень сыпучести порошков».

Герметичность упаковки. Испытание проводят для аэрозолей и пен в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи».

Для стерильных и, при необходимости, для нестерильных мазей, упакованных в тубы, испытание проводят в рамках контроля технологического

процесса производства мазей в соответствии с ОФС «Мази».

Испытание клапанного устройства. Испытание проводят для аэрозолей и пен, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Дополнительные испытания проводят, если продукты вымывания из системы упаковки и укупорки лекарственной формы могут оказать влияние на безопасность и эффективность лекарственного средства.

В рамках контроля технологического процесса производства растворы для инфузий в полимерной упаковке должны быть подвергнуты испытаниям по показателям «**Абсорбция в ультрафиолетовой области спектра», «Восстанавливающие вещества», «Гемолитически действующие вещества»** в соответствии с .требованиями соответствующих ОФС.

Твердые лекарственные формы (гранулы, лиофилизаты, порошки и таблетки), а также лекарственные растительные препараты, сборы могут быть предназначены для приготовления некоторых восстановленных лекарственных форм (раствора, суспензии, эмульсии, капель, спрея, концентрата, геля, пасты), а также настоев, отваров.

Жидкая лекарственная форма «Концентрат» предназначена для приготовления разбавленных (разведенных) жидких лекарственных форм (раствора, суспензии, эмульсии).

Восстановленные и разбавленные лекарственные формы, полученные из других лекарственных форм путем их растворения (разбавления), диспергирования, экстрагирования и т.д., должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных лекарственных форм.

УПАКОВКА

Выбор упаковки для каждой лекарственной формы осуществляют в соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Материалы первичной и вторичной упаковки должны быть разрешены для производства данного вида упаковки с учетом способа/пути введения и применения лекарственной формы.

Упаковка должна обеспечивать качество лекарственного препарата в лекарственной форме в течение установленного срока годности в заявленных условиях хранения.

Упаковка стерильных лекарственных форм должна обеспечивать стерильность и, как правило, иметь контроль первого вскрытия.

Дополнительные требования, предъявляемые к упаковке лекарственных форм, должны отвечать требованиям соответствующей ОФС на лекарственную форму (ОФС «Аэрозоли и спреи», ОФС «Пены», ОФС «Газы медицинские», ОФС «Капли», ОФС «Растворы», ОФС «Суспензии» и др.).

Многодозовая упаковка жидких лекарственных форм для приема внутрь может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

Упаковка лекарственных форм для вагинального, ректального, внутриматочного введения, а также, при необходимости, упаковка лекарственных форм для применения в полости рта, для применения в полости носа, для орошения и т.д., должна быть приспособлена для соответствующего введения или снабжена подходящей насадкой, аппликатором.

Упаковка капель может представлять собой флакон-капельницу или может быть снабжена специальным приспособлением – средством дозирования каплями в виде вставки-капельницы, крышки-капельницы, насадки-дозатора, пипетки и др.

Упаковка аэрозолей и спреев и все ее элементы, включая распылительные, дозирующие устройства, насадки, предохранительные колпачки и т.п., должны соответствовать требованиям ОФС «Упаковка,

маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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.

Маркировка лекарственных препаратов в лекарственных формах, предназначенных для приготовления пациентом или медицинским персоналом восстановленных или разбавленных (разведенных) лекарственных форм, должна содержать информацию о способе получения, условиях хранения и сроках годности восстановленной/разведенной лекарственной формы.

На упаковках шипучих лекарственных форм (гранул, порошков, таблеток) должна быть предупредительная надпись о необходимости предварительного их растворения перед применением.

Для лекарственных форм в многодозовой недозированной упаковке необходимо указывать условия хранения и срок годности после первого вскрытия упаковки.

Аэрозоли и спреи	**ОФС.1.4.1.0002.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 2**

Аэрозоли – лекарственная форма, представляющая собой раствор, эмульсию или суспензию, находящуюся под давлением пропеллента в герметичной упаковке (аэрозольный баллон), снабженной клапанно-распылительной системой, обеспечивающей высвобождение содержимого в виде дисперсии твердых или жидких частиц в газе, размер которых соответствует пути введения.

Спреи – лекарственная форма, представляющая собой раствор, эмульсию или суспензию, высвобождение которых происходит за счет давления воздуха, создаваемого с помощью механического распылителя насосного типа или при сжатии полимерной упаковки, обеспечивающей высвобождение содержимого в виде дисперсии твердых или жидких частиц в воздухе, размер которых соответствует пути введения.

По сравнению с аэрозолями спреи не содержат пропеллента и являются более грубодисперсной 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.

В зависимости от пути введения и способа применения различают аэрозоли и спреи для местного применения, для наружного применения, для нанесения на слизистую оболочку полости рта, назальные, ушные, трансдермальные, подъязычные, а также аэрозоли для ингаляций.

Аэрозоли и спреи могут быть дозированными и недозированными.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Вспомогательные вещества, входящие в состав аэрозолей и спреев, должны быть разрешены к медицинскому применению, должны 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, бутилоксианизол, 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.

Спреи могут быть получены путем растворения/диспергирования в соответствующем растворителе лиофилизатов или порошков, предназначенных для получения спреев.

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

Упаковка недозированных аэрозолей и спреев должна быть снабжена средством доставки лекарственного препарата – распылительным или клапанно-распылительным устройством непрерывного действия; упаковка дозированных аэрозолей и спреев – дозирующим распылительным или дозирующим клапанно-распылительным устройством. Распылительное устройство должно регулировать высвобождение содержимого упаковки во время использования: скорость и полноту высвобождения, размер частиц дисперсии, однородность дозирования. Клапанно-распылительное устройство аэрозолей должно обеспечивать герметичность упаковки в нерабочем состоянии. Материалы, используемые в производстве распылительных и дозирующих устройств (полимеры, эластомеры, металл), должны быть инертны по отношению к содержимому упаковки.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании аэрозолей

и спреев должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные аэрозоли и спреи производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Аэрозоли и спреи должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данных лекарственных форм.

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

Порошки и лиофилизаты, предназначенные для получения лекарственных препаратов в виде лекарственной формы «спрей», должны выдерживать требования ОФС «Порошки» и ОФС «Лиофилизаты» соответственно.

Описание. Аэрозоли и спреи при высвобождении из упаковки образуют жидкость (раствор, суспензию, эмульсию) или мягкую пену (пенные аэрозоли). Указывают цвет жидкости (пены) и, при необходимости, запах аэрозоля или спрея.

Для аэрозолей и спреев, представляющих собой эмульсии и суспензии, может наблюдаться расслаивание, но они должны легко реэмульгироваться и ресуспендироваться при встряхивании для обеспечения равномерного распределения действующего вещества в лекарственном средстве.

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

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/см^2).

Герметичность упаковки. Испытание проводят только для аэрозолей.

Метод 1. Аэрозольный баллон без колпачка и распылителя или насадки полностью погружают в водяную баню при температуре (45 ± 5) °С 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.

Испытание клапанного устройства. Испытание проводят для аэрозолей, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Методика определения должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации

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, представляющих собой растворы. Испытание аэрозолей для ингаляций 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 *($m_{ср}$)* 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 дозами. 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 ($n_{ср}$) в одной упаковке вычисляют по формуле:

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

где: $m_{ср}$ – средняя масса одной дозы, г.

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

Однородность дозирования. Испытание проводят для дозированных аэрозолей и спреев, представляющих собой эмульсии или суспензии. Испытание аэрозолей для ингаляций 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.

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, испытание на однородность дозирования должно быть выполнено для каждого вещества.

Размер частиц. Испытание проводят для аэрозолей и спреев, представляющих собой суспензию действующих веществ и не предназначенных для ингаляций. Методики определения и требования к размеру частиц должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Респирабельная фракция. Испытание проводят для аэрозолей, предназначенных для ингаляций, в соответствии с требованиями ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц». Нормы указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вода. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в

фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все аэрозоли и спреи, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные аэрозоли и спреи должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС Стерильность».

Масса содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных аэрозолей и спреев в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

Упаковка аэрозолей и спреев и все ее элементы, включая распылительные, дозирующие устройства, насадки, предохранительные колпачки и т.п., должны соответствовать требованиям ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для аэрозолей должны быть предусмотрены предупредительные надписи: «Хранить вдали от источника огня, отопительной системы и прямых солнечных лучей», «Не вскрывать», «Предохранять от падений и ударов» и, при необходимости, другие надписи.

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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

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 или имплантационного введения в ткани глаза.

К жидким глазным лекарственным формам для местного применения относят капли глазные и растворы для промывания глаз (примочки глазные).

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.

Капли глазные с пролонгированным высвобождением – глазные капли, характеризующиеся высвобождением действующего вещества в течение продолжительного периода времени.

Растворы для промывания глаз (примочки глазные) – водные растворы, предназначенные для смачивания и промывания глаз, а также для пропитывания материалов, накладываемых на глазное яблоко.

К мягким глазным лекарственным формам для местного применения относят мази глазные, гели глазные, кремы глазные.

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

К твердым глазным лекарственным формам для местного применения

относят пленки глазные.

Пленки глазные – твердые дозированные лекарственные формы, состоящие из пленкообразователя и одного или нескольких действующих веществ, предназначенные для помещения в конъюнктивальный мешок глаза (конъюнктивальную полость).

К жидким инъекционным глазным лекарственным формам относят жидкие дозированные лекарственные формы, представляющие собой водные растворы для внутриглазного введения, для парабульбарного введения, для субконъюнктивального введения.

Раствор для внутриглазного введения – стерильный раствор, предназначенный для введения в глазное яблоко.

Раствор для парабульбарного введения – стерильный раствор, предназначенный для введения в клетчатку, окружающую глазное яблоко.

Раствор для субконъюнктивального введения – стерильный раствор, предназначенный для введения под конъюнктиву.

К твердым глазным лекарственным формам для имлантационного введения относят имплантат глазной.

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

Имплантат интравитреальный – имплантат глазной, предназначенный для введения в заднюю камеру глаз.

Глазные лекарственные формы могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными из других твердых лекарственных форм непосредственно перед применением в виде восстановленных лекарственных форм.

Капли глазные в виде восстановленной лекарственной формы могут быть получения из таблеток для приготовления капель глазных, порошков для приготовления капель глазных или лиофилизатов для приготовления капель глазных.

Таблетки, порошки или лиофилизаты для приготовления капель глазных – стерильные таблетки, порошки или лиофилизаты, предназначенные для получения глазных капель непосредственно перед применением, путем растворения или диспергирования их в соответствующем растворителе.

Инъекционные глазные лекарственные формы в виде восстановленных лекарственных форм могут быть получены из порошков для приготовления растворов для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения или лиофилизатов для приготовления растворов для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения.

Порошки или лиофилизаты для приготовления растворов для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения – порошки или лиофилизаты, предназначенные для получения водных растворов для инъекционного введения их в ткани глаза непосредственно перед применением, путем растворения их в соответствующем растворителе.

Глазные лекарственные формы могут быть дозированными и недозированными.

Упаковка глазных лекарственных форм может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Способ получения глазных лекарственных форм зависит от вида лекарственной формы.

Все глазные лекарственные формы должны быть стерильны. Методы и условия стерилизации глазных лекарственных форм должны соответствовать требованиям ОФС «Стерилизация».

Осмоляльность глазных лекарственных форм должна находиться в пределах осмоляльности 0,6 – 2,0 % раствора натрия хлорида. Допускается получение и применение гипер- и гипоосмотических капель глазных, но, как правило, состав капель глазных с концентрацией действующих веществ ниже эквивалентной 0,6 % концентрации раствора натрия хлорида, подлежит коррекции посредством 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 (например, натрия сульфит, натрия метабисульфит, натрия тиосульфат), комплексообразователи (например, натрия эдетат), консерванты (например, бензиловый спирт, хлорбутанолгидрат, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, бензалкония хлорид, борная кислота в концентрации 1,9-2,0 %), вещества, регулирующие pH среды (например, 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 вспомогательные вещества-пролонгаторы, разрешенные для медицинского применения. Оптимальной для капель глазных является вязкость 5-15 $мм^2/с$. Показатель вязкости капель глазных может отличаться от оптимальных значений, но, как правило, не должен превышать 150 $мм^2/с$.

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, должна быть предусмотрена технология, обеспечивающая получение и контроль необходимого размера частиц.

ИСПЫТАНИЯ

Все глазные лекарственные формы должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для испытуемой лекарственной формы.

Описание. Указывают внешний вид и основные физические и органолептические свойства, характерные для испытуемой глазной лекарственной формы.

Стерильность. Испытание проводят для всех глазных лекарственных форм в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Однородность дозирования. Испытание проводят для всех дозированных глазных лекарственных форм и глазных лекарственных форм в однодозовой упаковке в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Капли глазные, представленные водными растворами, подвергают испытаниям по показателям качества: **«Прозрачность»**, **«Цветность»**, **«pH»**, **«Осмоляльность»**, **«Видимые механические включения»** в соответствии с требованиями соответствующих ОФС: ОФС«Прозрачность и степень мутности», ОФС «Степень окраски жидкостей», ОФС «Ионометрия», ОФС «Осмолярность», ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и нормативными значениями показателей, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Капли глазные, представленные растворами высокомолекулярных соединений, дополнительно контролируют по показателю **«Вязкость».**

Оценку вязкости капель глазных, представленных растворами производных целлюлозы в концентрации до 10 мг/мл, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» методом капиллярной вискозиметрии при 20°С.

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

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» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капли глазные суспензионного типа контролируют по показателям **«pH»**, **«Осмоляльность»** в соответствии с требованиями соответствующих ОФС: ОФС «Ионометрия», ОФС «Осмолярность»; по показателям **«Размер частиц»** и **«Седиментационная устойчивость»** в соответствии с требованиями, указанными в соответствующих разделах ОФС «Суспензии», а также нормативными значениями исследуемых показателей в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации

Капли глазные эмульсионного типа контролируют по показателям **«pH»**, **«Осмоляльность»**, **«Вязкость»** в соответствии с требованиями соответствующих ОФС: ОФС «Ионометрия», ОФС «Осмолярность», ОФС «Вязкость»; по показателям **«Размер частиц»** в соответствии с требованиями, указанными в соответствующем разделе ОФС «Эмульсии», а также нормативными значениями исследуемых показателей в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

Растворы для промывания глаз (примочки глазные) подвергают испытаниям, аналогичным испытаниям для капель глазных, представленных водными растворами.

Мази, кремы и гели глазные должны соответствовать требованиям ОФС «Мази» и следующим дополнительным требованиям и нормативным значениям.

Размер частиц. Испытание проводят для мазей, кремов и гелей глазных гетерогенного и комбинированного типа по следующей методике.

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. В каждом образце, содержащем 10 мкг твердого действующего вещества, допускается наличие не более 20 частиц с максимальным размером более 25 мкм, из которых не более двух частиц могут быть с максимальным размером более 50 мкм, не допускается наличия частиц с максимальным размером более 90 мкм.

Металлические частицы. Испытание проводят для мазей глазных, упаковка которых представляет собой металлические тубы.

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 °С 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 микрометра, 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).

Герметичность упаковки. Испытание проводят для мазей глазных, упакованных в тубы, в рамках контроля технологического процесса производства мазей, в соответствии с требованиями ОФС «Мази».

Вязкость. Испытание проводят для гелей глазных, представленных растворами карбомера, в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» методом ротационной вискозиметрии при 25°С.

Пленки глазные из биорастворимых полимеров по показателям «**Размеры пленки», «Однородность дозирования», «Однородность массы», «Потеря в массе при высушивании»** должны соответствовать требованиям ОФС «Пленки» и нормативным требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Время растворения. Испытание проводят для пленок глазных из биорастворимых полимеров в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации, в которых должны быть указаны среда растворения, условия проведения испытания, количество образцов,

время растворения и др. Как правило, пленки глазные должны раствориться в в растворе натрия хлорида 0,9 % в течение 2-3 ч.

Раствор, полученный при растворении пленок глазных из биорастворимых полимеров, исследуют по показателям **«Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «pH», «Видимые механические включения»** в соответствии с требованиями ОФС: ОФС «Степень окраски жидкостей», ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ОФС «Ионометрия», ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Инъекционные глазные лекарственные формы должны соответствовать требованиям, предъявляемым к лекарственным формам для инъекций, в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», в том числе, по показателям **«Осмоляльность»** и «**Невидимые механические включения»**, а также нормативным требованиям, указанным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Имплантаты глазные, включая *имплантаты интравитреальные*, должны соответствовать требованиям ОФС «Имплантаты» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения.

Таблетки, порошки и лиофилизаты для приготовления капель глазных должны соответствовать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Таблетки», ОФС «Порошки», ОФС «Лиофилизаты». Восстановленные глазные капли, полученные с использованием таблеток, порошков и лиофилизатов, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям, предъявляемым к глазным каплям, указанным в настоящей общей фармакопейной статье. В фармакопейной статье или нормативном документе указывают **«Время растворения /диспергирования»** и, при необходимости, **«Описание»** полученной

лекарственной формы.

Порошки или лиофилизаты для приготовления растворов для субконъюнктивального/внутриглазного/парабульбарного введения, а также восстановленные инъекционные растворы для субконъюнктивального/ внутриглазного/парабульбарного введения, полученные с использованием порошков и лиофилизатов для приготовления указанных инъекционных растворов, должны соответствовать требованиям ОФС«Лекарственные формы для парентерального применения» и настоящей общей фармакопейной статьи.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Глазные лекарственные формы выпускают в стерильных однодозовых и многодозовых упаковках с контролем первого вскрытия.

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

Объем глазной примочки в многодозовой упаковке должен быть не более 200 мл, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

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

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Гранулы	**ОФС.1.4.1.0004.18** **Взамен ОФС.1.4.1.0004.15**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на гранулы резано-прессованные.

Гранулы резано-прессованные должны соответствовать требованиям ОФС «Гранулы резано-прессованные».

Гранулы – твердая лекарственная форма в виде агрегатов частиц порошка любой формы.

Гранулы могут содержать одно или несколько действующих веществ с добавлением вспомогательных веществ.

Различают гранулы без оболочки и гранулы, покрытые оболочкой.

Термин *«гранулы»* используют для гранул, предназначенных для приема внутрь.

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

В зависимости от пути введения и способа применения различают гранулы для рассасывания, гранулы для приготовления лекарственных форм, гранулы шипучие.

Гранулы для рассасывания – гранулы, помещаемые в полость рта, растворяющиеся или распадающиеся при рассасывании с целью оказания местного действия.

Гранулы могут быть использованы для приготовления других лекарственных форм (капли, растворы, суспензии, сиропы) путем растворения/диспергирования их в соответствующем растворителе. Для таких гранул используют термин *«Гранулы для приготовления…»* с

указанием наименования получаемой лекарственной формы и пути ее введения (способа применения), например, «гранулы для приготовления суспензии для приема внутрь».

Выделяют также *гранулы шипучие,* в состав которых введены органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, реагирующие в присутствии воды с выделением углерода диоксида, предназначенные для растворения/диспергирования в воде перед приемом внутрь.

По типу высвобождения различают гранулы с обычным и модифицированным высвобождением.

Гранулы кишечнорастворимые – гранулы для приема внутрь с отсроченным высвобождением, покрытые специальной оболочкой или содержащие специальные вещества, или полученные с использованием специальной технологии, которые обеспечивают устойчивость в желудочном соке (гастрорезистентность) и обычное высвобождение действующих веществ в кишечном соке.

Гранулы с пролонгированным высвобождением – гранулы для приема внутрь, покрытые специальной оболочкой, или содержащие специальные вспомогательные вещества, или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ.

Гранулы кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением – гранулы кишечнорастворимые, покрытые специальной оболочкой или содержащие специальные вспомогательные вещества, или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ.

Гранулы с модифицированным высвобождением – гранулы, полученные по специальной технологии, в состав оболочки и/или содержимого которых входят специальные вспомогательные вещества для изменения скорости, и/или времени, и/или места высвобождения действующего вещества, предназначенные для приема внутрь. Использование термина «модифицированное высвобождение» возможно

лишь в тех случаях, когда неприменимы термины «кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением», «с пролонгированным высвобождением» или «кишечнорастворимые».

Разновидностью гранул являются *пеллеты,* которые представляют собой твердые частицы сферической формы без оболочки или покрытые оболочкой, обладающие свойством сыпучести, содержащие одно или несколько действующих веществ различной консистенции с добавлением вспомогательных веществ

Гранулы могут быть дозированными и недозированными.

Упаковка дозированных гранул может быть однодозовой и многодозовой.

Гранулы, включая пеллеты, могут быть использованы в качестве фармацевтических субстанций при производстве других лекарственных форм (например, капсул, таблеток, суспензий и др.).

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Производство гранул осуществляется с применением методов сухого или влажного гранулирования, структурной грануляции и др.

Гранулы, покрытые оболочкой, получают последовательным нанесением слоев пленкообразующего покрытия на частицы действующего вещества (веществ) любым подходящим способом.

В производстве гранул и при покрытии их оболочками применяют различные вспомогательные вещества: связующие, разбавители, способствующие скольжению и др. В состав гранул шипучих входят органические кислоты и карбонаты/гидрокарбонаты, а также могут быть введены корригенты вкуса, стабилизаторы, консерванты, красители.

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

Стерильные гранулы производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста

микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Гранулы должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Восстановленные лекарственные формы, полученные с использованием гранул, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных лекарственных форм. В фармакопейной статье или нормативной документации указывают **«Время растворения/диспергирования»** и, при необходимости, **«Описание»** полученной лекарственной формы.

Описание. Указывают форму, цвет, наличие оболочки. Гранулы могут иметь различную форму – круглую, цилиндрическую, неправильную; пеллеты, как правило, имеют сферическую (шарообразную) форму. Гранулы должны быть однородны по окраске, если нет других указаний в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Размер гранул. Размер гранул должен быть в пределах от 0,2 до 3 мм. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ» в рамках контроля технологического процесса производства гранул.

Размер гранул, представляющих собой пеллеты, может быть в пределах от 0,5 до 5 мм. Определение размера и распределения по размерам пеллет проводят в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ», если указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность массы. Испытание проводят для дозированных гранул в многодозовой упаковке и гранул в однодозовой индивидуальной упаковке в

соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание не применяют в случае, если проводят испытание на однородность дозирования.

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями 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.

Гранулы кишечнорастворимые. 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 более 3 ч. Гранулы не должны распадаться и обнаруживать признаки растрескивания и размягчения. На втором этапе кислоту заменяют фосфатным буферным раствором с pH 6,8. Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то в буферном растворе гранулы должны распадаться в течение 1 ч.

Гранулы шипучие. Испытание проводят по следующей методике. В стакан, содержащий 200 мл воды при температуре от 15 до 25° С, помещают одну дозу гранул – наблюдается интенсивное выделение пузырьков газа. Гранулы считаются распавшимися, если после прекращения выделения газа они или растворились, или диспергировали 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 для дозированных гранул в соответствии с требованиями 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 испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Однородность дозирования. Гранулы в однодозовой индивидуальной упаковке и дозированные гранулы в многодозовой упаковке должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Масса содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных гранул в многодозовой упаковке в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. Все гранулы должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для гранул, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капсулы **ОФС.1.4.1.0005.18**

Взамен ОФС.1.4.1.0005.15

Капсулы – твердая дозированная лекарственная форма, содержащая одно или несколько действующих веществ, заключенных в твердую или мягкую оболочку различного размера и вместимости.

Содержимое капсул может представлять собой действующее вещество (вещества) различной консистенции (твердой, жидкой, мягкой) с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

В зависимости от типа оболочки различают капсулы 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.

В зависимости от пути введения и способа применения различают капсулы жевательные, подъязычные, вагинальные, внутриматочные, ректальные, капсулы с порошком для ингаляций.

Термин *«капсулы»* используют для капсул, предназначенных для приема внутрь.

Капсулы жевательные – мягкие капсулы, предназначенные для разжевывания с целью высвобождения содержимого в полость рта и оказания местного или системного действия после всасывания действующего вещества через слизистую оболочку полости рта или в желудочно-кишечном тракте после проглатывания.

Капсулы подъязычные – капсулы, предназначенные для помещения под язык с целью оказания системного действия.

Капсулы вагинальные – капсулы, предназначенные для введения во влагалище с целью оказания местного действия.

Капсулы внутриматочные – мягкие капсулы, предназначенные для введения в полость матки, высвобождающие содержимое в течение продолжительного периода времени.

Капсулы ректальные – мягкие капсулы вытянутой формы с жидким или мягким содержимым, предназначенные для введения в прямую кишку с целью оказания местного действия.

Капсулы с порошком для ингаляций – капсулы, содержащие порошок, предназначенный для ингаляционного введения с помощью соответствующего ингалятора в дыхательную систему, с целью оказания местного или системного действия в нижних дыхательных путях и легких.

По типу высвобождения действующего вещества различают капсулы с обычным и модифицированным высвобождением.

Капсулы кишечнорастворимые – капсулы для приема внутрь с

отсроченным высвобождением, полученные путем заполнения гастрорезистентными гранулами или частицами или путем использования специальной технологии, которые обеспечивают устойчивость в желудочном соке (гастрорезистентность) и обычное высвобождение действующих веществ в кишечном соке.

Капсулы с пролонгированным высвобождением – капсулы для приема внутрь, содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующего вещества (действующих веществ) лекарственного препарата.

Капсулы кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением– капсулы кишечнорастворимые, содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ.

Капсулы с модифицированным высвобождением – капсулы для приема внутрь, полученные по специальной технологии, или в состав оболочки и/или содержимого которых входят специальные вспомогательные вещества, для изменения скорости и/или времени и/или места высвобождения действующего вещества. Использование термина «модифицированное высвобождение» возможно лишь в тех случаях, когда неприменимы термины «кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением», «с пролонгированным высвобождением» или «кишечнорастворимые».

Упаковка капсул может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

В качестве вспомогательных веществ, входящих в состав содержимого капсул, могут быть использованы растворители, разбавители, эмульгаторы, смазывающие, разрыхляющие и другие вещества.

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.

Твердые капсулы получают внесением содержимого капсулы (преимущественно 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 мягким**.** Твердые вещества, вводимые в мягкие капсулы, обычно растворяют/диспергируют в соответствующем растворителе, разрешенном к медицинскому применению.

Содержимое капсул не должно разрушать капсульную оболочку. Оболочка должна разрушаться в месте оказания действия с высвобождением действующего вещества (веществ).

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

ИСПЫТАНИЯ

Капсулы должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Капсулы с порошком для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

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

Приводят описание содержимого капсул.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных

форм». Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

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

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

Капсулы кишечнорастворимые Испытание проводят в два этапа со следующими изменениями. В качестве жидкой среды на первом этапе используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М и не используют диски. Капсулы должны оставаться неповрежденными в кислой среде в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, но не менее 1 ч и не более 2 ч. Повреждением капсулы считается любое нарушение целостности оболочки капсулы, позволяющее содержимому капсулы выйти в окружающую среду На втором этапе кислоту заменяют фосфатным буферным раствором с pH 6,8. Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то в буферном растворе капсулы должны распадаться в течение 1 ч, используя диски.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» согласно указаниям фармакопейной статьи или нормативной документации. Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Микробиологическая чистота. Капсулы должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

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

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные формы для ингаляций	**ОФС.1.4.1.0006.15** **Вводится впервые**

Лекарственные формы для ингаляций – жидкие, мягкие 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 могут содержать одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в соответствующем носителе.

Для введения лекарственных форм для ингаляций в легкие могут быть использованы специальные устройства (ингаляторы, небулайзеры и др.).

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

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

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), мягкие (мази) и жидкие лекарственные формы для ингаляций. Выделяют три категории лекарственных препаратов,

которые могут быть введены в дыхательную систему в виде жидких лекарственных форм.

А. Лекарственные формы, образующие пары при добавлении в горячую воду или при помощи соответствующего устройства (например, ингалятора), предназначенные для вдыхания с целью оказания местного или системного действия. К лекарственным формам для ингаляций, оказывающим необходимое действие в парообразном состоянии, относят *растворы для ингаляций, капли для ингаляций, эмульсии для ингаляций, настойки для ингаляций,* а также *мази для ингаляций* и *таблетки для ингаляций,* которые предназначены для растворения или диспергирования в жидкой среде перед применением.

Б. Жидкие лекарственные формы, предназначенные для преобразования в аэрозоль для ингаляций (для распыления) с помощью соответствующего устройства (например, небулайзера). Лекарственные формы для ингаляций, оказывающие необходимое действие в виде аэрозоля после распыления их с помощью ингалятора, могут представлять собой *растворы для ингаляций, суспензии для ингаляций* или *эмульсии для ингаляций.* Условно к этой категории также можно отнести лекарственные формы (например, таблетки, порошки, концентраты и др.), предназначенные для получения указанных лекарственных форм для ингаляций путем растворения или диспергирования в соответствующем растворителе.

Небулайзер – ингалятор, обеспечивающий преобразование жидкого лекарственного средства для распыления в дисперсию в газовой среде (аэрозоль) при помощи, как правило, электрической энергии. Небулайзеры должны обеспечивать образование дисперсных частиц подходящего размера для доставки действующего вещества в дыхательные пути и легкие. Различают компрессорные, ультразвуковые небулайзеры, либо иного типа.

В. Лекарственные формы для ингаляций, находящиеся под давлением в упаковке с дозирующей клапанно-распылительной системой. К таким лекарственным формам относят *аэрозоли и спреи для ингаляций,* которые в

свою очередь могут представлять собой растворы, суспензии или эмульсии.

Лекарственные формы для ингаляций могут быть дозированными и недозированными.

Аэрозоль для ингаляций дозированный – аэрозоль, предназначенный для ингаляционного введения в дыхательную систему с целью оказания местного или системного действия в нижних дыхательных путях и легких и выпускаемый в упаковке с дозирующим устройством.

Порошки для ингаляций содержат одну или несколько доз порошка. Порошки применяют при помощи порошковых ингаляторов, приспособленных для использования с однодозовыми 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.

Порошок для ингаляций дозированный – порошок, предназначенный для ингаляционного введения с помощью соответствующего ингалятора в дыхательную систему, с целью оказания местного или системного действия в нижних дыхательных путях и легких.

Капсулы с порошком для ингаляций – капсулы, содержащие порошок, предназначенный для ингаляционного введения с помощью соответствующего ингалятора в дыхательную систему с целью оказания местного или системного действия в нижних дыхательных путях и легких.

Тампоны лекарственные для ингаляций – тампоны лекарственные, как правило, помещаемые в соответствующие аппликаторы цилиндрической формы с закругленными концом и отверстием, предназначенные для ингаляций через носовые ходы.

Упаковка лекарственных форм для ингаляций может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственных форм для ингаляций, 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.

В зависимости от типа лекарственной формы и природы действующего вещества (веществ) лекарственные препараты для ингаляций 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.

Порошки для ингаляций содержат одно или несколько тонкодисперсных действующих веществ вместе с инертными вспомогательными веществами – «носителями» (обычно лактоза) или без них». При производстве порошков для ингаляций действующие вещества микронизируют, то есть измельчают в специальных микронизирующих устройствах.

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

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании лекарственных форм для ингаляций должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота». Стерильные лекарственные формы для ингаляций производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Лекарственные формы для ингаляций должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания,

характерные для данной лекарственной формы.

Лекарственные формы, предназначенные для ингаляций, представляющие собой растворы, капли, суспензии, эмульсии, настойки, таблетки, мази, порошки, капсулы, аэрозоли и тампоны лекарственные должны соответствовать требованиям ОФС «Растворы», ОФС «Капли», ОФС «Суспензии», ОФС «Эмульсии», ОФС «Настойки», ОФС «Таблетки», ОФС «Мази», ОФС Порошки», ОФС «Капсулы», ОФС «Аэрозоли и спреи», ОФС «Тампоны лекарственные».

pH. Испытание проводят для лекарственных форм, предназначенных для ингаляций в парообразном состоянии, а также для жидких лекарственных форм, предназначенных для распыления с помощью небулайзера. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иначе, то значение pH жидких лекарственных форм или твердых и мягких лекарственных форм после их растворения/диспергирования должно быть от 3,0 до 8,5.

Механические включения. Испытание проводят для дозированных аэрозолей для ингаляций и дозированных порошков для ингаляций в соответствии с методикой, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

50 доз лекарственной формы пропускают через фильтр, который затем рассматривают под микроскопом, снабженным подходящим окуляром. Определяют количество частиц с диаметром более 100 мкм, учитывая фоновое загрязнение реактивов путем проведения контрольного опыта. Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иначе, допускается наличие не более 50 частиц диаметром 100 мкм и более в 50 дозах лекарственной формы.

Количество доз. Испытание проводят для дозированных лекарственных форм для ингаляций, снабженных дозирующим устройством, одновременно с испытанием по показателю «Однородность доставляемой

дозы». Количество доз должно быть не менее указанного на этикетке.

Респирабельная фракция. Испытание проводят для аэрозолей для ингаляций, порошков для ингаляций, капсул с порошком для ингаляций, а также жидких лекарственных форм, предназначенных для распыления и снабженных индивидуальными небулайзерами. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность доставляемой дозы (однородность дозирования). Испытание проводят для дозированных лекарственных форм для ингаляций. Контроль данного показателя для лекарственных форм 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 должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации и должна включать в себя отбор доз в начале, в середине и в конце использования ингалятора,

Методика определения однородности доставляемой дозы для аэрозолей для ингаляций.

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±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 определения доставляемой дозы 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 для определения однородности дозирования в порошковых ингаляторах, представленный на рис. 2 и описанный в таблице. Размеры фильтров и трубок должны быть приемлемы для используемой скорости потока.

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 (Р1), 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 H_2O). 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.

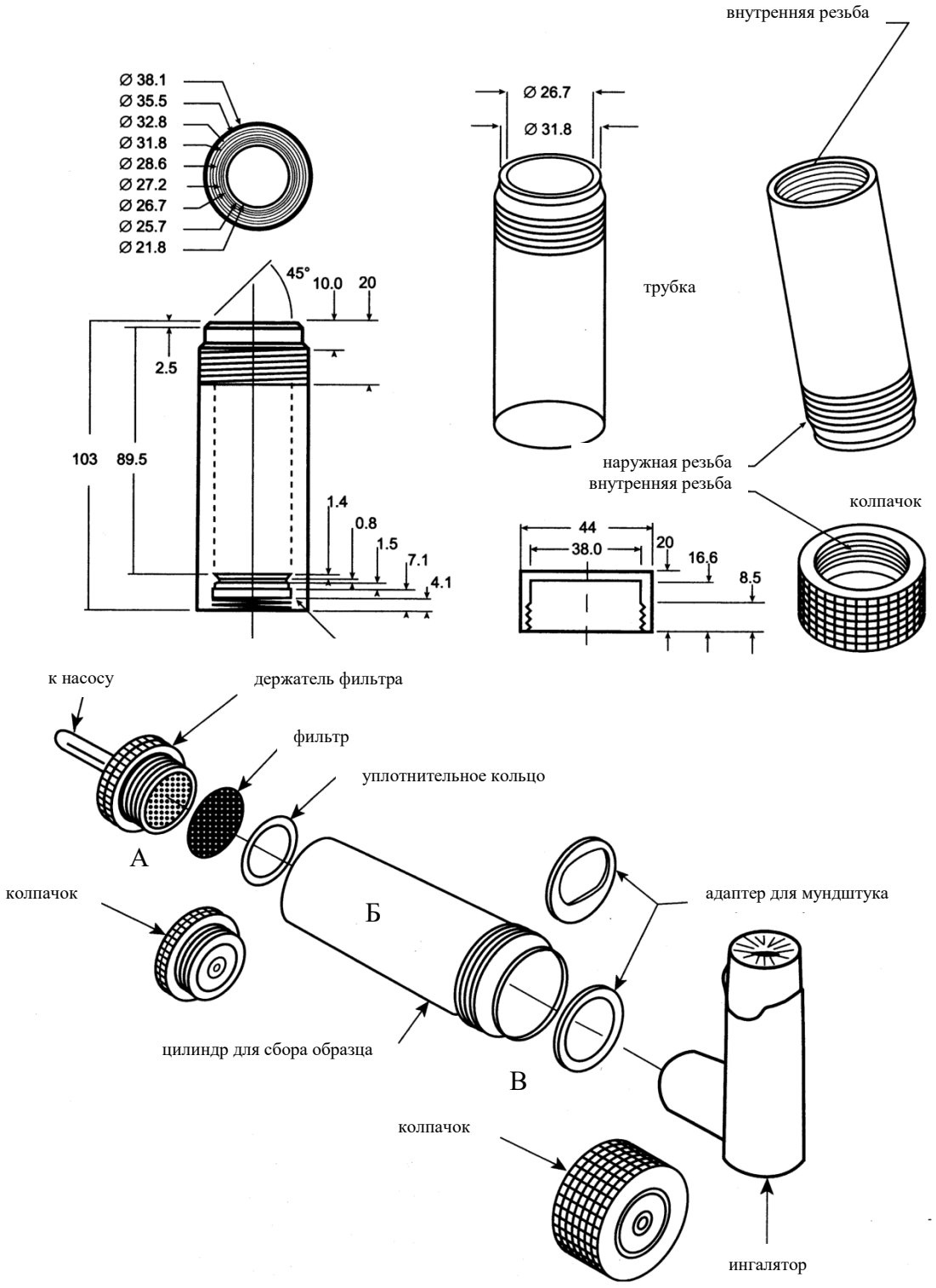


Рис. 1 – Прибор для сбора дозы в дозированных лекарственных формах, находящихся под давлением. *Размеры приведены в мм*

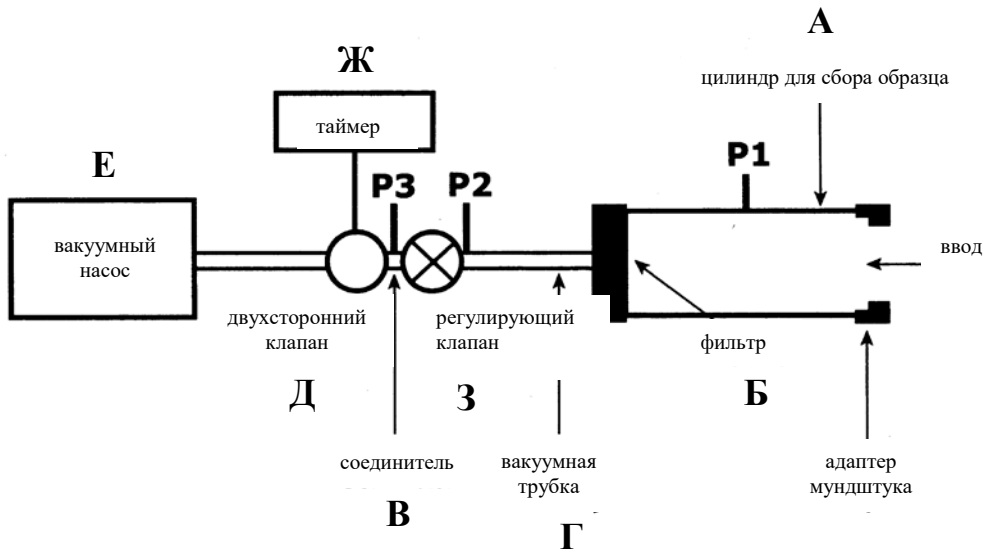


Рис. 2 – Прибор для определения однородности дозирования в порошковых ингаляторах

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) х 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 Р3 меньшего диаметра
Г	Вакуумная трубка	Трубка ≥ (8 ± 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
Р1	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
Р2 Р3	Измерители давления	Измерители абсолютного давления
З	Регулирующий клапан	Клапан, регулирующий воздушный поток с максимальным значением Cv ≥ 1

В случае если скорость потока превышает 100 л/мин, с помощью регулирующего клапана (3) 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 ≤ 0,5, в противном случае производят увеличение мощности насоса и повторяют измерения.

В случае ингаляторов, предназначенных для использования капсул с порошком для ингаляций, 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.

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 %.

Микробиологическая чистота. Лекарственные формы для ингаляций должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные лекарственные формы для ингаляций должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных лекарственных форм для ингаляций в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовые упаковки лекарственных форм для ингаляций категории В должны быть снабжены дозирующим устройством.

Упаковка порошков для ингаляций дозированных 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 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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»**

Лекарственные формы для парентерального применения представляют собой стерильные жидкие, мягкие или твердые 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 жидким лекарственным формам для парентерального применения относят: растворы для инъекций, суспензии для инъекций, эмульсии для инъекций; растворы для инфузий, эмульсии для инфузий; суспензии для имплантации.

Растворы для инъекций – стерильные водные или неводные растворы действующего вещества (веществ) в соответствующем растворителе, предназначенные для инъекционного введения в определенные ткани или органы или в сосудистое русло.

Суспензии для инъекций – стерильные суспензии, предназначенные для инъекционного введения в определенные ткани или органы.

Суспензии для инъекций с пролонгированным высвобождением – суспензии для инъекций, содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ.

Эмульсии для инъекций – стерильные эмульсии типа «масло в воде», предназначенные для инъекционного введения в определенные ткани или органы или в сосудистое русло.

Лекарственные формы для инъекционного введения в определенные ткани, могут быть предназначены для подкожного введения, для

внутрикожного введения, для внутримышечного введения, для накожного скарификационного нанесения, для околосуставного введения, для проведения прик-теста и др.

Лекарственные формы для инъекционного введения в определенные органы, могут быть предназначены для внутриполостного введения, для внутрибрюшинного введения, для внутрипузырного введения, для внутрисуставного введения, для внутрисердечного введения, для интратекального введения, для экстраамниального введения и др.

Лекарственные формы для инъекционного введения в сосудистое русло (для внутрисосудистого введения) могут быть предназначены для внутривенного введения, для внутриартериального введения, для внутрикоронарного введения, для интралимфатического введения и др.

Лекарственные формы для инъекционного введения в ткани глаза должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Растворы для инфузий – стерильные водные растворы, предназначенные для парентерального применения, путем, как правило, медленного, часто капельного введения в циркулирующий кровоток с помощью инфузионных систем в объеме 100 мл и более.

Эмульсии для инфузий – стерильные эмульсии типа «масло в воде», предназначенные для парентерального применения, путем, как правило, медленного, часто капельного введения в циркулирующий кровоток с помощью инфузионных систем в объеме 100 мл и более.

Суспензии для имплантации – стерильные суспензии, предназначенные для имплантации с целью оказания системного действия в течение продолжительного периода времени.

К мягким лекарственным формам для парентерального применения относят гели для инъекций, гели для подкожного введения.

Гели для инъекций – стерильные гидрофильные гели, предназначенные

для инъекционного введения в определенные ткани и органы.

Гели для подкожного введения – стерильные гидрофильные гели, предназначенные для введения непосредственно под кожу.

К твердым лекарственным формам для парентерального применения относят имплантаты, таблетки для имплантации.

Имплантаты – стерильная твердая лекарственная форма, за исключением таблеток для имплантации, имеющая подходящие для введения в ткани тела размеры и форму, предназначенная для имплантации и высвобождающая действующее вещество в течение длительного периода времени. Как правило, вводится подкожно, в иных случаях указывается путь введения.

Таблетки для имплантации – стерильные таблетки, получаемые путем прессования, предназначенные для имплантации, обычно подкожной, с целью оказания местного или системного действия в течение продолжительного периода времени.

Лекарственные формы для парентерального применения могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными непосредственно перед применением в виде восстановленных лекарственных форм из порошков или лиофилизатов для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм или в виде разведенных лекарственных форм из концентратов для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм.

Порошки для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм или лиофилизаты для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм – стерильные порошки или лиофилизаты, предназначенные для получения растворов или суспензий для парентерального применения непосредственно перед применением путем растворения или диспергирования их в соответствующем стерильном растворителе.

Концентраты для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм – стерильные жидкие лекарственные формы, предназначенные для получения инъекционных или инфузионных лекарственных форм после разведения (разбавления) в соответствующем стерильном растворителе до требуемой концентрации.

Лекарственные формы для парентерального применения могут быть дозированными и недозированными.

Упаковка лекарственных форм для парентерального применения может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Способ получения парентеральных лекарственных форм зависит от вида лекарственной формы.

Все лекарственные формы для парентерального применения должны быть стерильны. Методы и условия стерилизации лекарственных форм для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Стерилизация».

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

В качестве растворителей для получения водных растворов, кроме воды для инъекций, можно использовать изотонический раствор натрия хлорида, раствор Рингера, раствор глюкозы 5 % и др.

Для получения неводных растворов используют жирные растительные масла или другие органические растворители.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, 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 или нормативной документации 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 или нормативной документации.

В качестве вспомогательных веществ, повышающих стабильность лекарственных форм для парентерального применения, используют аскорбиновую, хлористоводородную, винную, лимонную, уксусную кислоты, натрия карбонат и натрия гидрокарбонат, натрия гидроксид, калия или натрия сульфит, натрия гидросульфит или натрия метабисульфит, натрия тиосульфат, динатрия эдетат, натрия цитрат, натрия фосфат одно- или двузамещенные. В качестве антимикробных консервантов используют метилпарагидроксибензоат и пропилпарагидроксибензоат, хлорбутанол, крезол, фенол и другие вспомогательные вещества.

Количество используемых вспомогательных веществ, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, 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 антимикробные консерванты добавляют независимо от способа стерилизации, за исключением тех случаев, когда действующее вещество обладает антимикробной активностью.

Лекарственные формы для парентерального применения при разовой дозе, превышающей 15 мл, за исключением специальных случаев, а также лекарственные формы для внутриполостных, 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 соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для испытуемой лекарственной формы.

Описание. Указывают внешний вид и основные органолептические и другие свойства лекарственной формы для парентерального применения, характерные для испытуемой лекарственной формы.

Стерильность. Испытание проводят для всех лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины или Пирогенность. Испытание проводят для всех лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» или

ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Аномальная токсичность» для лекарственных форм для парентерального применения, полученных 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 или нормативной документации.

Гистамин и/или Депрессорные вещества. Испытания проводят для лекарственных форм для парентерального применения, предназначенных для внутрисосудистого введения и полученных из фармацевтических субстанций, которые могут обладать депрессорным действием (субстанции микробиологического или животного происхождения), в соответствии с требованиями ОФС «Испытание на гистамин» и ОФС «Испытание на депрессорные вещества».

pH. Испытание проводят для жидких лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Видимые механические включения. Испытание проводят для лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения. Испытание проводят для лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Однородность дозирования. Испытание проводят для всех дозированных лекарственных форм для парентерального применения и лекарственных форм для парентерального применения в однодозовой

упаковке в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Извлекаемый объем. Испытание проводят для лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Растворы для инъекций дополнительно контролируют по показателям**: «Прозрачность»**, **«Цветность»** в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ОФС «Степень окраски жидкостей» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейных статей или нормативной документации.

Растворы для инъекций, содержащие высокомолекулярные соединения и другие вязкие растворы для инъекций дополнительно контролируют по показателю **«Вязкость»** в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» и нормативными значениями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Масляные растворы для инъекций дополнительно контролируют по показателю **«Плотность»** в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и нормативными значениями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Эмульсии для инъекций должны соответствовать требованиям ОФС «Эмульсии», включая показатель **«Вязкость».**

Эмульсии для внутрисосудистого введения дополнительно контролируют по показателю **«Размер частиц»** в соответствии с методикой и нормативными значениями, указанными в фармакопейных статьях и нормативной документации. Если не указано другое в фармакопейной статье или нормативной документации, то размер частиц не должен превышать 5 мкм.

Суспензии для инъекций должны отвечать требованиям ОФС «Суспензии», включая показатели **«Размер частиц»**, **«Проходимость**

через иглу», «Седиментационная устойчивость».

Растворы для инфузий, эмульсии для инфузий должны соответствовать требованиям, предъявляемым к растворам для инъекций и эмульсиям для инъекций.

Осмоляльность. Для инфузионных лекарственных препаратов рассчитывают значение теоретической осмолярности. В случае если теоретическая осмолярность не может быть рассчитана, должно быть определено среднее значение осмоляльности в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Концентраты для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм должны соответствовать требованиям ОФС «Концентраты» и настоящей общей фармакопейной статье.

Разведенные лекарственные формы для инъекций или разведенные лекарственные формы для инфузий, полученные с использованием концентратов для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм, должны соответствовать требованиям настоящей общей фармакопейной статье, предъявляемым к лекарственным формам для инъекций или лекарственным формам для инфузий.

Испытания по показателям «Прозрачность», «Цветность» и «pH» проводят на разведенной лекарственной форме, полученной при разбавлении концентрата тем растворителем и в той концентрации, которые указаны в инструкции по применению, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

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

Восстановленные лекарственные формы для парентерального применения, полученные с использованием порошков и лиофилизатов, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать

требованиям настоящей ОФС, предъявляемым к лекарственным формам для инъекций или лекарственным формам для инфузий. В фармакопейной статье или нормативной документации указывают **«Время растворения/диспергирования»** и, при необходимости **«Описание»** полученной лекарственной формы.

Испытания по показателям «Прозрачность», «Цветность», «pH» и «Механические включения» проводят на восстановленной лекарственной форме, полученной при растворении/диспергировании порошков или лиофилизатов в том растворителе и в той концентрации, которые указаны в инструкции по применению, если нет других указаний в фармакопейной статье.

Гели для инъекций должны соответствовать требованиям ОФС «Мази». Дополнительно гели для инъекций контролируют по показателям: **«Прозрачность»**, **«Цветность», «Вязкость»** в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ОФС «Степень окраски жидкостей», ОФС «Вязкость» и требованиями, указанными в фармакопейных статей или нормативной документации.

Имплантаты для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Имплантаты», в том числе по показателям **«Размеры имплантата», «Однородность массы», «Однородность дозирования», «Растворение»;** требованиям настоящей общей фармакопейной статьи, предъявляемым к лекарственным формам для парентерального применения, а также нормативным требованиям, указанным в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Таблетки для имплантации должны соответствовать требованиям ОФС «Таблетки» и требованиям настоящей общей фармакопейной статьи, предъявляемым к лекарственным формам для парентерального применения.

Дополнительные испытания лекарственных форм для парентерального применения проводят, если продукты вымывания из

системы упаковки и укупорки лекарственной формы могут оказать влияние на безопасность и эффективность лекарственного средства.

В рамках контроля технологического процесса производства растворы для инфузий в полимерной упаковке должны быть подвергнуты испытаниям по показателям «**Абсорбция в ультрафиолетовой области спектра», «Восстанавливающие вещества», «Гемолитически действующие вещества»** в соответствии с .требованиями соответствующих ОФС.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Лекарственные формы для парентерального применения могут быть выпущены в однодозовых (ампулы, картриджи, преднаполненные шприцы и др.) или в многодозовых (бутылки и др.), содержащих несколько доз действующего вещества. Объем лекарственной формы для парентерального применения в однодозовой упаковке должен быть достаточным для однократного введения, но не должен превышать 1 л.

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

Имплантаты и таблетки для имплантации упаковывают в индивидуальные стерильные упаковки.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для инфузионных лекарственных форм дополнительно указывают состав лекарственного препарата, для инфузионных растворов – значение осмолярности.

Стерильные лекарственные формы для парентерального применения

должны иметь надпись «Стерильно». В случаях получения лекарственного препарата в асептических условиях без последующей стерилизации конечного продукта должна быть надпись «Приготовлено асептически».

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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Мази **ОФС.1.4.1.0008.18**

Взамен ОФС.1.4.1.0008.15

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 однофазной основы, в которой растворены или диспергированы твердые или жидкие действующие вещества.

Кремы – мягкая лекарственная форма в виде многофазной системы, состоящей из липофильной типа «вода/масло» и гидрофильной типа «масло/вода» фаз или множественной эмульсии.

Гели – мягкая лекарственная форма в виде коллоидной дисперсии, полученная путем гелеобразования с использованием специальных веществ.

Пасты – мягкая лекарственная форма, содержащая значительное количество (более 25%) тонкоизмельченных твердых веществ.

Линименты – мягкая лекарственная форма для местного применения, обладающая свойством текучести при температуре тела.

В зависимости от пути введения и способа применения различают мази для наружного применения, для местного применения, вагинальные, ректальные, назальные, ушные и др.

К лекарственным формам для применения в полости рта относят гели гидрофильные, собственно мази, кремы и пасты для нанесения на слизистую оболочку полости рта; линименты и гели периодонтальные; гели и пасты для

нанесения на десны; гели зубные и стоматологические; пасты лекарственные стоматологические.

Гели (как правило, гидрофильные) и пасты могут быть для приема внутрь, а также могут быть использованы для приготовления суспензий для приема внутрь путем диспергирования гелей или паст в соответствующем растворителе.

Различают также лекарственные формы для введения в полости тела с помощью соответствующих аппликаторов: гели эндоцервикальные или линименты эндоцервикальные предназначены для введения в канал шейки матки, а гели уретральные – для введения в мочеиспускательный канал.

Гели интестинальные – гели, предназначенные для введения в кишечник (двенадцатиперстную кишку, тонкую кишку, подвздошную кишку, толстую кишку) с помощью соответствующего устройства.

Гели трансдермальные – гели, предназначенные для нанесения на кожу с целью оказания системного действия за счет проникновения действующих веществ в кровоток через кожный барьер.

К *лекарственным формам для ингаляций* относят мази для ингаляций, представляющие собой мази, образующие пары при добавлении в горячую воду или при помощи соответствующего устройства (например, ингалятора), предназначенные для вдыхания с целью оказания местного действия.

К *глазным лекарственным формам* относят мази, кремы и гели глазные, которые представляют собой стерильные лекарственные формы, предназначенные, как правило, для нанесения на слизистую оболочку глаза (конъюнктиву).

К *лекарственным формам для парентерального применения* относят гели для инъекций и гели для подкожного введения, представляющие собой стерильные гидрофильные гели, предназначенные для инъекционного введения в определенные ткани и органы или для введения непосредственно под кожу.

В зависимости от основы выделяют мази на:

- гидрофобной основе;

- гидрофильной основе;

- дифильной основе;

- эмульсионной основе;

- многофазной основе.

Разновидностью мазей (собственно мазей, линиментов и др.) мягкой или жидкой консистенции являются *бальзамы,* представляющие собой, как правило, гомогенные смеси фармацевтических субстанций растительного происхождения жидкой, реже твердой консистенции (смол, эфирных масел, растительных жирных масел и др.) с добавлением или без добавления других действующих веществ и вспомогательных веществ.

Упаковка мазей может быть однодозовой и многодозовой.

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 – основы типа «масло/вода» (композиция липофильных компонентов, 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 типа «вода/масло» образуются при использовании таких эмульгаторов, как спирты шерстного воска, сложные эфиры, моноглицериды и жирные спирты. Эмульсии типа «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 твердых полиэтиленгликолей. В состав таких основ могут быть введены липофильные вещества и эмульгаторы типа «масло/вода».

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

Кремы на гидрофильной эмульсионной основе приготовлены на основе эмульсии типа «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 поверхностно-активными веществами.

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.).

Мази выпускаются готовыми к применению, но в отдельных случаях гели и пасты могут быть приготовлены непосредственно перед применением из порошков, предназначенных для их приготовления.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании мазей должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая

чистота». Стерильные мази производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Мази должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Восстановленные суспензии для приема внутрь, полученные с использованием гелей и паст, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС «Суспензии». В фармакопейной статье или нормативной документации указывают **«Время диспергирования»** и, при необходимости, **«Описание»** полученной лекарственной формы.

Мази, кремы, гели, предназначенные для приготовления глазных лекарственных форм, должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Гели, предназначенные для инъекций, для подкожного введения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Мази для ингаляций должны выдерживать требования ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Описание. Мази представляют собой субстанцию мягкой консистенции. Мази должны быть однородными, не должны иметь прогорклого запаха, а также признаков физической нестабильности (агрегации частиц, фазового расслоения, коагуляции). Бальзамы, как правило, имеют специфический запах и характерную окраску.

Указывают внешний вид и характерные органолептические свойства.

Размер частиц. Испытание проводят для мазей гетерогенного и комбинированного типа, содержащих компоненты в виде твердой дисперсной фазы.

Размер частиц определяют методом оптической микроскопии в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия».

Возможно определение методом лазерной дифракции света в соответствии с требованиями ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света».

Методика определения размера частиц методом оптической микроскопии. Оборудование. 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: посередине 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 концентрация 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.

Размер частиц не должен превышать 100 мкм при отсутствии других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации

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. Испытание проводят для стерильных и, при необходимости, для нестерильных мазей, упакованных в тубы, в рамках контроля технологического процесса производства мазей, по следующей методике.

Отбирают 10 туб с мазями и тщательно вытирают наружные поверхности туб фильтровальной бумагой. Тубы помещают в горизонтальном положении на лист фильтровальной бумаги и выдерживают в термостате при температуре (60±3) °С 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.

Результаты испытания считают неудовлетворительными, если подтеки наблюдаются более чем из одной тубы.

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

pH. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определяют pH водной вытяжки из мази или pH самой мази. Значение pH и методики определения приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Кислотное число и перекисное число. Испытание проводят для мазей, в состав которых входят вещества, способные к гидролизу и окислению, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число» и ОФС «Перекисное число». Нормативные требования и методики определения приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все мази, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные мази должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Масса содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Упаковка назальных, ушных, ректальных, вагинальных и др. мазей может иметь дополнительное устройство для введения лекарственного препарата или может быть укомплектована соответствующим аппликатором.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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.

Пластыри медицинские **ОФС.1.4.1.0009.18**

Взамен ОФС.1.4.1.0009.15

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на пластыри трансдермальные.

Пластыри трансдермальные должны соответствовать требованиям ОФС «Пластыри трансдермальные».

Пластыри медицинские – лекарственная форма в виде основы, нанесенной на подложку, содержащей одно или несколько действующих веществ, или в виде прокладки с действующим веществом (веществами), закрепленной на подложке с липким слоем, предназначенная для наружного или местного применения и обладающая способностью прилипать к коже или слизистым оболочкам.

Для пластырей медицинских, предназначенных для наклеивания на поврежденную или неповрежденную поверхность кожи с целью оказания местного действия, используют термин *«пластырь».*

Пластырь для слизистой оболочки полости рта – пластырь медицинский, предназначенный для наклеивания на слизистую оболочку полости рта с целью оказания системного действия в течение определенного периода времени, по истечению которого он удаляется.

Пластыри в виде липкой ленты или в виде иной формы, не содержащие действующего вещества (веществ), используемые с целью фиксации повязок, компрессов, тампонов и других целей, не относят к пластырям медицинским, так как они не являются лекарственными средствами.

Основа пластырей медицинских представляет собой пластичную

однородную адгезивную (липкую) массу (пластырную массу), в которой равномерно распределено действующее вещество (вещества), или прокладку с действующим веществом (веществами), закрепленную на подложке с липким слоем.

В зависимости от состава основы различают пластыри медицинские: смоляно-восковые, каучуковые, акриловые, свинцовые и др.

Свинцовые пластыри имеют форму брусков, цилиндров, плиток, палочек и др. и представляют собой пластырную массу без подложки.

Подложка пластырей медицинских (гибкий плоский носитель) может быть выполнена из ткани, нетканых или полимерных материалов. Подложка может быть с перфорацией и без перфорации.

В зависимости от материала и вида подложки различают пластыри медицинские на тканевой, нетканой или полимерной основе, а также пластыри перфорированные.

Пластыри медицинские с липкой стороны должны быть покрыты защитной пленкой.

Упаковка пластырей медицинских может быть однодозовой и многодозовой, а также может содержать набор пластырей медицинских.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Технология производства пластырей медицинских и перечень используемых вспомогательных веществ зависят от вида пластырей.

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

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

Пластырная основа каучуковых (резиновых) пластырей медицинских представляют собой смесь каучука со смолами, действующими и вспомогательными веществами. Данный вид пластырей длительное время сохраняет свою клейкость.

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

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

Подложка, полученная из синтетических или природных материалов, и адгезивный (липкий) слой основы должны быть гипоаллергенны и не должны оказывать на кожу и слизистые раздражающего действия.

Защитная пленка должна препятствовать контакту липкого слоя пластырей медицинских с окружающей средой и удаляться перед применением.

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

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании пластырей медицинских должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные пластыри медицинские производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Пластыри медицинские должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Указывают форму пластыря медицинского, которая может быть прямоугольной, круглой, фигурной и др.; геометрические размеры

пластыря, наличие перфорации.

Приводят описание цвета, запаха, однородности пластырной массы, материала подложки, защитной пленки.

Количество пластырной массы. Испытание проводят для пластырей медицинских, в которых содержание действующего вещества выражено на грамм пластырной массы. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации; результат выражают в г/м^2.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят для свинцовых пластырей в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Потеря в массе должна быть не более 1,0 %.

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

Количественное определение. Количественное содержание действующего вещества в пластырях медицинских выражают в миллиграммах на пластырь, или на грамм пластырной массы, или на грамм прокладки.

Количественное содержание действующего вещества в свинцовых пластырях (пластырях без подложки) выражают в процентах.

Микробиологическая чистота. Все пластыри медицинские, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для пластырей медицинских, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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.

Порошки **ОФС.1.4.1.0010.15**

Взамен ГФ X, ст. 565,
ст. ГФ XI, вып. 2

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

Порошки могут содержать одно или несколько действующих веществ с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

В зависимости от пути введения и способа применения различают порошки для наружного применения, для местного применения, для приема внутрь, назальные, периодонтальные, ушные, для ингаляций.

Порошки назальные – порошки, предназначенные для назального применения путем вдувания в полость носа.

Порошки периодонтальные – порошки, предназначенные для нанесения в карман между зубом и десной.

Порошки ушные – порошки, предназначенные для введения в наружный слуховой проход.

Порошки могут быть использованы для приготовления других лекарственных форм путем растворения/диспергирования в соответствующем растворителе: капель, концентратов, растворов, сиропов, спреев, суспензий, а также для приготовления гелей, паст. Лекарственные формы, полученные из порошков, предназначенных для их приготовления, в свою очередь могут быть использованы для приема внутрь, наружного, местного, парентерального применения. Для таких порошков используют термин «*Порошки для приготовления…*» с указанием наименования получаемой лекарственной формы и пути ее введения (способа применения), например, «порошки для приготовления раствора для приема внутрь».

Выделяют также *порошки шипучие*, в состав которых введены органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, реагирующие в присутствии воды с выделением углерода диоксида, предназначенные для растворения/диспергирования в воде перед приемом внутрь.

Порошки могут быть дозированными и недозированными.

Упаковка дозированных порошков может быть однодозовой и многодозовой.

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 разрешенные к медицинскому применению индифферентные наполнители, солюбилизаторы, корригенты вкуса, красители, консерванты.

Порошки могут содержать вспомогательные вещества, обеспечивающие растворение или диспергирование в соответствующем растворителе, предотвращающие слеживаемость, снижающие гигроскопичность, регулирующие или стабилизирующие pH или стабилизирующие действующее вещество и др.

В состав шипучих порошков входят органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, которые в присутствии воды быстро реагируют с выделением углерода диоксида.

Порошки для ингаляций содержат одно или несколько тонкодисперсных действующих веществ вместе с инертными вспомогательными веществами – «носителями» (обычно лактоза) или без них.

В зависимости от пути введения и способа применения лекарственного препарата в лекарственной форме «порошок» или лекарственной формы, для

приготовления которой предназначен порошок, к порошкам предъявляют различные требования в отношении дисперсности (измельченности). 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 порошков, содержащих несколько действующих веществ, каждое вещество измельчают отдельно и просеивают через соответствующее сито в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ». При производстве порошков для ингаляций действующие вещества микронизируют, то есть измельчают в специальных микронизирующих устройствах.

При изготовлении в аптечных организациях порошков, содержащих наркотические, психотропные или ядовитые и сильнодействующие вещества, находящиеся под контролем в соответствии с международными правовыми нормами, в количествах менее 0,05 г на всю массу порошков, используют тритурации – смеси действующих веществ с молочным сахаром или другими вспомогательными веществами, разрешенными к медицинскому применению в соотношении 1:100 или 1:10.

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

Стерильные порошки производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Порошки должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Восстановленные лекарственные формы, полученные с использованием порошков, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных лекарственных форм. В фармакопейной статье или нормативной документации указывают **«Время растворения/диспергирования»** и, при необходимости, **«Описание»** полученной лекарственной формы.

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

Порошки, предназначенные для приготовления растворов или суспензий для парентерального применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Порошки для ингаляций должны выдерживать требования ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Описание. Порошки представляют собой субстанцию твердой консистенции. Указывают цвет и, при необходимости, требования к кристалличности, гигроскопичности, запаху.

Размер частиц. 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. При необходимости размер частиц определяют ситовым анализом в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ» или другим валидированным методом.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» или

ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

pH. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия. Значение pH указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Испытание проводят для дозированных порошков и порошков в однодозовых индивидуальных упаковках в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Однородность массы дозированных лекарственных форм. Испытание проводят для дозированных порошков и порошков в однодозовых индивидуальных упаковках в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Микробиологическая чистота. Все порошки, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для порошков, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

Масса содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных порошков в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

В рамках контроля технологического процесса производства порошки могут быть подвергнуты испытаниям по показателям **«Определение сыпучести», «Определение угла естественного откоса», «Определение насыпного объема»** в соответствии с .требованиями ОФС «Степень сыпучести порошков».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Каждую дозу дозированных порошков расфасовывают в индивидуальную упаковку или по несколько доз в упаковку со специальным устройством для дозирования отдельной дозы.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворы	**ОФС.1.4.1.0011.18** **Взамен ОФС.1.4.1.0011.15**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на растворы, предназначенные для парентерального, офтальмологического и ингаляционного применения.

Растворы для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Растворы для офтальмологического применения должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Растворы для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

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

Растворы могут содержать одно или более действующих и вспомогательных веществ.

В зависимости от пути введения и способа применения различают растворы для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения, вагинальные, внутриматочные, ректальные, для применения в полости рта, для применения в полости носа, для промывания слухового прохода, для гастроэнтерального введения, для эндотрахеального введения, трансдермальные, для орошения.

Растворы для гастроэнтерального введения – растворы,

предназначенные для введения в желудок или двенадцатиперстную кишку с помощью соответствующего устройства.

Растворы для эндотрахеального введения – стерильные растворы, предназначенные для введения в трахею и/или бронхиолы путем инстилляции.

К растворам для применения в полости рта относят растворы: *для полоскания, для промывания полости рта, для слизистой оболочки полости рта, для нанесения на десны, зубные.*

Растворы для полоскания – растворы, предназначенные для полоскания полости рта и (или) глотки.

К растворам для применения в полости носа относят *растворы для промывания полости носа и растворы для эндосинусиального введения.*

Растворы для эндосинусиального введения – стерильные растворы, предназначенные для введения в синусы (пазухи) полости носа с целью оказания местного действия.

Растворы для орошения – стерильные водные растворы большого объема, предназначенные для орошения полостей тела (*растворы для орошения желудка, растворы для орошения мочевого пузыря)*, а также для орошения ран и поверхностей, например, во время хирургических операций.

Растворы трансдермальные – растворы, предназначенные для контролируемой доставки действующего вещества в системный кровоток путем пассивной диффузии через неповрежденную кожу.

В зависимости от природы растворителя (растворителей) различают *растворы водные и неводные.* В свою очередь, неводные растворы могут представлять собой *растворы спиртовые, масляные, глицериновые* и т.д.

В зависимости от природы действующего вещества (веществ) различают растворы истинные, растворы высокомолекулярных соединений, коллоидные растворы и т.д.

Такие лекарственные формы как «Капли», «Концентраты», «Сиропы» могут представлять собой раствор.

Для обозначения некоторых лекарственных форм, представляющих собой растворы, также применяют и другие термины (определения).

Микстуры – для обозначения растворов, а также других жидких лекарственных форм преимущественно экстемпорального изготовления, предназначенных для приема внутрь и дозируемых ложками.

Ароматные воды – для обозначения лекарственных форм, представляющих собой водные или водно-спиртовые растворы, насыщенные компонентами эфирных масел.

Жидкости – для обозначения растворов, представляющих собой жидкое действующее вещество как таковое или смеси жидких действующих веществ, без растворителя. Термин не должен применяться для растительных, в том числе жирных или эфирных или минеральных масел, а также животных жиров.

Лаки для ногтей лекарственные – для обозначения жидких лекарственных форм, представляющих собой неводные растворы действующих веществ, предназначенные для нанесения на ногтевую пластинку с целью получения лакового покрытия после испарения летучих растворителей.

Клей жидкий (клей кожный, пластырь жидкий) – для обозначения жидких лекарственных форм, представляющих собой неводные растворы, предназначенные для наружного применения с целью получения пленкообразующего покрытия, обладающего способностью прилипать к коже после испарения летучих растворителей.

Упаковка растворов может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Растворы получают растворением действующих и вспомогательных веществ в соответствующем растворителе или смеси растворителей.

Растворители (смеси растворителей) выбирают, исходя из свойств и природы действующего вещества (веществ), для обеспечения отсутствия возможного химического и физико-химического взаимодействия между

растворителем и действующим веществом (веществами). Растворитель (смеси растворителей) не должен оказывать влияния на фармакологическую активность действующего вещества (веществ).

В качестве основного растворителя для получения водных растворов используют воду очищенную, соответствующую требованиям ФС «Вода очищенная».

Растворы для орошения содержат действующие вещества являющиеся, как правило, электролитами или осмотическими активными веществами, растворенными в воде для инъекций, соответствующей требованиям ФС «Вода для инъекций». В ряде случаев раствор для орошения может состоять только из воды для инъекций.

В неводных растворах основными растворителями являются спирт этиловый различных концентраций, масла жирные растительные, масло вазелиновое, глицерин и др.

Для получения спиртовых растворов в качестве основного растворителя используют спирт 96 %, соответствующий требованиям ФС «Спирт этиловый 95%, 96%», который при необходимости разводят водой очищенной до требуемой концентрации.

В качестве *вспомогательных веществ* при изготовлении/производстве растворов могут быть использованы подходящие антимикробные консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы, солюбилизаторы, сорастворители, корригенты и другие вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению.

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

Растворы могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными непосредственно перед применением в виде восстановленных лекарственных форм из порошков, гранул, таблеток или

лиофилизатов, предназначенных для приготовления растворов путем растворения в соответствующих растворителях.

Растворы в виде разведенной лекарственной формы могут быть приготовлены из концентратов, предназначенных для получения растворов после разведения (разбавления) в соответствующем растворителе до требуемой концентрации.

Кроме того, для получения растворов используют *стандартные фармакопейные растворы*, являющиеся разновидностью концентрированных растворов, и представляющих собой водные или спиртовые растворы промышленного производства, содержащие строго определенные концентрации действующих веществ в соответствии с требованиями соответствующих фармакопейных статей.

При получении растворов используют, как правило, массо-объемный способ приготовления. Растворы также могут быть получены по массе или по объему в зависимости от природы действующих веществ и растворителя (вязкие, летучие растворители и др.).

Содержание действующих веществ в растворе выражают в процентной концентрации (массо-объемной, массовой или объемной).

При получении растворов воду и водные растворы, близкие по плотности к воде, отмеривают, твердые вещества (действующие и вспомогательные) – отвешивают. Растворители и растворы, плотность которых больше или меньше 1,0 – отвешивают.

При получении растворов высокомолекулярных соединений учитывают природу действующего вещества (веществ). 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 получения растворов коллоидных соединений (протаргол, колларгол) используют дополнительные технологические операции, обеспечивающие гидратацию коллоидных частиц.

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

Получение спиртовых растворов не подразумевает нагревание.

Ароматные воды могут быть получены различными способами: перегонкой эфирномасличного лекарственного 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 %.

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

Растворы для орошения, растворы для эндотрахеального и для эндосинусиального введения, а также другие стерильные растворы, производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность». При получении стерильных растворов используют методы стерилизации в соответствии с ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Растворы должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Сиропы, представляющие собой раствор, должны соответствовать требованиям ОФС «Сиропы».

Капли, представляющие собой раствор, должны соответствовать требованиям ОФС «Капли».

Порошки, таблетки, гранулы, лиофилизаты и концентраты для приготовления растворов должны отвечать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Порошки», ОФС «Таблетки», ОФС Гранулы», ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Концентраты».

Описание. Приводят описание цвета, прозрачности раствора, запаха – при наличии

Прозрачность. Испытание проводят для стерильных растворов, растворов для приема внутрь, растворов для местного применения в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», для остальных растворов – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации.

Цветность. Испытание проводят для стерильных растворов, растворов для приема внутрь, растворов для местного применения в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей» обязательно, для остальных растворов – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации.

pH или «Кислотность или щелочность». Испытание проводят для водных, водно-спиртовых и спиртовых растворов при соответствующем указании в фармакопейной статье или нормативной документации**.**

Определение pH проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Допустимый интервал значений pH раствора должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации.

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

Плотность. Испытание проводят для спиртовых растворов, содержащих спирт этиловый в концентрации выше 40 %, и для других неводных растворов в соответствии с ОФС «Плотность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Испытание проводят для спиртовых растворов, содержащих спирт этиловый в концентрации ниже 40 % в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вязкость. Испытание проводят для растворов высокомолекулярных соединений в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Кислотное и перекисное число. Испытание проводят для масляных растворов в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число» и ОФС «Перекисное число» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Испытание проводят для растворов в однодозовых индивидуальных упаковках, кроме растворов для наружного применения в однодозовых упаковках, в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Видимые механические включения. Испытание проводят для растворов для орошения в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Микробиологическая чистота. Все растворы, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для растворов для орошения, растворов для эндотрахеального и для эндосинусиального введения и других

растворов, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины или Пирогенность. Испытание проводят для растворов для орошения в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» или ОФС«Пирогенность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Извлекаемый объем. Испытание проводят для растворов, предназначенных для приема внутрь в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем». Испытание не применяют для растворов в однодозовых индивидуальных упаковках, если проводят испытание на однородность дозирования.

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят для всех растворов, за исключением растворов для приема внутрь, в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовая упаковка растворов для приема внутрь может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

Упаковка растворов для вагинального, ректального, внутриматочного введения, а также, при необходимости, упаковка растворов для применения в полости рта, для применения в полости носа, для орошения и т.д., должна быть приспособлена для соответствующего введения или снабжена подходящей насадкой, аппликатором.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Раствор для орошения, состоящий только из воды, отвечающей требованиям ФС «Вода для инъекций», должен иметь маркировку «Вода для орошения».

Растворы для орошения должны иметь дополнительные этикетки:

- лекарственный препарат не должен использоваться для инъекций;

- лекарственный препарат должен быть использован однократно, любой неиспользованный остаток должен быть уничтожен.

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.

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

Сиропы – жидкая лекарственная форма в виде водного раствора вязкой консистенции со сладким вкусом, содержащая сахарозу в концентрации не менее 45 % или ее заменители.

Сиропы, как правило, являются гомогенными дисперсными системами, но также могут представлять собой гетерогенные (чаще всего суспензии) или комбинированные дисперсные системы.

Термин *«сироп»* используют для сиропов, предназначенных для приема внутрь.

Упаковка сиропов может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Сиропы получают путем растворения в воде сахаров (сахарозы) 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, соков и т.д., а также вспомогательных веществ, производят после охлаждения сиропа до температуры (55 ± 5) ºС.

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.

В качестве антимикробных консервантов в состав сиропов обычно вводят вспомогательные вещества: спирт этиловый,

метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, сорбиновую кислоту, калия сорбат, натрия бензоат и др.

Сиропы, в виде восстановленных лекарственных форм, могут быть также получены из гранул или порошков, предназначенных для приготовления сиропов путем растворения в соответствующем растворителе.

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

ИСПЫТАНИЯ

Сиропы должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Порошки и гранулы, предназначенные для приготовления сиропов, должны соответствовать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Порошки» или ОФС «Гранулы».

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.

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

Однородность дозирования. Испытание проводят для сиропов в однодозовых индивидуальных упаковках в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Микробиологическая чистота. Все сиропы, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Извлекаемый объем. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем». Испытание не применяют для сиропов в однодозовых индивидуальных упаковках, если проводят испытание на однородность дозирования.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовая упаковка сиропов может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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.

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

Суппозитории – твердая дозированная лекарственная форма, предназначенная для введения в полость тела и расплавляющаяся (растворяющаяся, распадающаяся) при температуре тела.

Суппозитории могут содержать одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в подходящей суппозиторной основе.

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

В зависимости от пути введения различают суппозитории ректальные, суппозитории вагинальные и палочки.

Масса и размеры суппозиториев должны соответствовать пути их введения.

Суппозитории ректальные – суппозитории, предназначенные для введения в прямую кишку с целью оказания местного или системного действия. Ректальные суппозитории обычно имеют коническую или торпедообразную форму. 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.

Суппозитории вагинальные – суппозитории, предназначенные для введения во влагалище с целью оказания местного действия. Вагинальные суппозитории в основном имеют шарообразную или яйцевидную форму. Масса одного суппозитория должна находиться в пределах от 1,5 до 6 г.

Если масса не указана, то вагинальные суппозитории изготавливают массой 4 г.

Палочки – твердая дозированная лекарственная форма конической или цилиндрической формы, предназначенная для введения в естественные или патологические полости организма, способная расплавляться или растворяться при температуре тела.

В зависимости от пути введения различают палочки дентальные, назальные, периодонтальные, уретральные, ушные.

Палочки дентальные – палочки, предназначенные для помещения в зубной канал с целью оказания местного действия.

Палочки назальные – палочки, предназначенные для помещения в полость носа с целью оказания местного действия.

Палочки периодонтальные – палочки, предназначенные для помещения в карман между зубом и десной.

Палочки уретральные – стерильные палочки, предназначенные для введения в мочеиспускательный канал.

Палочки ушные – палочки, предназначенные для введения в наружный слуховой проход.

Палочки, как правило, 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.

Упаковка суппозиториев может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

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

В аптечных организациях суппозитории изготавливают методом ручного формования или выливания.

Основы, используемые при производстве суппозиториев, подразделяются 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.

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 формованием при минимально возможной температуре основы, необходимой для сохранения качества веществ и структурных свойств основы.

Метод прессования для производства суппозиториев 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 суппозиториев могут входить различные группы разрешенных для медицинского применения вспомогательных веществ: эмульгаторы, антимикробные консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы и другие.

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

Палочки вводимые в уретру и раны, а также другие стерильные палочки, производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность». Для получения стерильных палочек используют методы стерилизации в соответствии с ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Суппозитории должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета суппозиториев. Суппозитории должны иметь однородную массу, одинаковую форму и обладать твердостью, обеспечивающей удобство применения.

Однородность массы определяют визуально: на срезе суппозитория не должно быть вкраплений. На продольном срезе допускается наличие воздушного стержня или воронкообразного углубления. В отдельных случаях допускается наличие вкраплений на срезе, что должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Размер частиц. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия» для суппозиториев, в суппозиторную

основу которых действующие вещества введены в виде суспензии.

Методика определения, включая пробоподготовку, а также нормативные требования к размеру частиц указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Размер частиц не должен превышать 100 мкм, если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, то

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Испытание не применяют, если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Однородность дозирования» для всех действующих веществ.

Растворение. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» для суппозиториев на гидрофильной основе или в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для суппозиториев на липофильной основе» для суппозиториев на липофильной основе. Условия проведения испытания, нормативные требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Распадаемость. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с ОФС «Распадаемость суппозиториев и вагинальных таблеток». Суппозитории на липофильной основе должны распадаться в течение не более чем через 30 мин; суппозитории на гидрофильной основе – не более чем через 60 мин., если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то испытание по показателю «Распадаемость» проводить не требуется.

Если для суппозиториев на липофильной основе в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Температура плавления» или по показателю «Время полной деформации», то испытание по показателю «Распадаемость» проводить не требуется.

Для суппозиториев на липофильной основе проводят испытание по показателю «Температура плавления» или по показателю «Время полной деформации».

Температура плавления. Испытание проводят для суппозиториев на липофильной основе в соответствии с требованиями ОФС «Температура плавления», метод 2. Температура плавления суппозиториев не должна превышать 37 °С, если не указано другое в фармакопейной статье или нормативной документации.

Время полной деформации. Испытание проводят для суппозиториев на липофильной основе в соответствии с требованиями ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе». Время полной деформации суппозиториев не должно превышать 15 мин, если не указано другое в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Микробиологическая чистота. Суппозитории должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные палочки должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Упаковка вагинальных, ректальных суппозиториев может иметь дополнительное устройство для введения лекарственного препарата или может быть укомплектована соответствующим аппликатором.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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 **ОФС.1.4.1.0014.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып. 2

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

Суспензия, содержащая диспергированные частицы размером менее 1 мкм, представляет собой микрогетерогенную дисперсную систему.

В зависимости от пути введения и способа применения различают суспензии для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения, вагинальные, ректальные, зубные, для слизистой оболочки полости рта, для ингаляций, для имплантации, для гастроэнтерального введения, для эндосинусиального введения, для эндотрахеального введения, для парентерального применения, для применения в форме глазных капель.

Суспензии для эндосинусиального введения – стерильные суспензии, предназначенные для введения в синусы (пазухи) полости носа.

Суспензии для эндотрахеального введения – стерильные суспензии, предназначенные для введения в трахею и/или бронхиолы путем инстилляции.

Суспензии для имплантации – стерильные суспензии, предназначенные для имплантации с целью оказания системного действия в течение продолжительного периода времени.

Упаковка суспензий может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Суспензии могут быть получены диспергированием твердой дисперсионной фазы, содержащей нерастворимое, предварительно

измельченное, действующее вещество (вещества), с жидкой дисперсионной средой или другими методами.

Дисперсионной средой может быть вода, глицерин, растительные жирные масла и др. 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 вещества, разрешенные к медицинскому применению.

Суспензии могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными непосредственно перед применением в виде восстановленных лекарственных форм из порошков, гранул, таблеток или лиофилизатов, предназначенных для приготовления суспензии путем диспергирования в соответствующем растворителе.

Суспензии для приема внутрь также могут быть получены из гелей или паст, предназначенных для приготовления суспензий для приема внутрь путем диспергирования мягких лекарственных форм (гелей, паст) в соответствующих растворителях.

Кроме того, суспензии в виде разведенной лекарственной формы могут быть приготовлены из концентратов, предназначенных для получения суспензии после разведения (разбавления) в соответствующем растворителе до требуемой концентрации.

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

Стерильные суспензии производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в соответствии с ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Суспензии должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Суспензии для парентерального применения должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Суспензии, предназначенные для применения в форме капель глазных должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Суспензии для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Порошки, гранулы, таблетки, лиофилизаты, концентраты, гели, пасты для приготовления суспензий должны отвечать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Порошки», ОФС «Гранулы», ОФС «Таблетки», ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Концентраты» или ОФС Мази».

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

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

Размер частиц. Испытание проводят методом оптической микроскопии в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия» или методом лазерной дифракции в соответствии с требованиями ОФС «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света».

Методика определения размера частиц методом оптической микроскопии. Определенное количество суспензии, соответствующее 10 мкг твердого действующего 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 суспензий, предназначенных для применения в форме капель глазных (капель глазных суспензионного типа) на 10 мкг твердого действующего 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. Испытание проводят для суспензий, предназначенных для парентерального применения в соответствии с методикой, 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. Испытание 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 для приема внутрь, время ресуспендирования должно быть не более 1 мин, для суспензий, предназначенных для применения в форме 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, для приема внутрь, для применения в форме капель глазных оно должно быть не менее 2-3 мин.

Испытание не применяют для восстановленных суспензий для приема внутрь в однодозовых упаковках.

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

Однородность дозирования. Испытание проводят для суспензий в однодозовых индивидуальных упаковках в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Микробиологическая чистота. Все суспензии, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для суспензий, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

Извлекаемый объем. Испытание проводят для суспензий для приема внутрь в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем». Испытание не

применяют для суспензий в однодозовых индивидуальных упаковках, если проводят испытание на однородность дозирования.

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят для всех суспензий, за исключением суспензий для приема внутрь, в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовая упаковка суспензий для приема внутрь может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

Упаковка суспензий для вагинального, ректального введения, а также, при необходимости, упаковка суспензий для применения в полости рта, должна быть приспособлена для соответствующего введения или снабжена подходящей насадкой, аппликатором.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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 **ОФС.1.4.1.0015.15**

Взамен ГФ X, ст. 654,
ст. ГФ XI, вып. 2

Таблетки – твердая дозированная лекарственная форма, получаемая путем прессования порошков или гранул или другим подходящим способом.

Таблетки могут содержать одно или несколько действующих веществ с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

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

Различают таблетки без оболочки и таблетки, покрытые оболочкой.

Для таблеток для приема внутрь без оболочки используют термин «*таблетки*».

Таблетки, покрытые оболочкой – таблетки для приема внутрь, покрытые одним или несколькими слоями, состоящими из смеси различных вспомогательных веществ и в ряде случаев действующих веществ.

Таблетки, покрытые пленочной оболочкой – таблетки для приема внутрь, покрытые оболочкой, представляющей собой очень тонкое полимерное покрытие (как правило, не превышающее 10% от массы таблетки).

В зависимости от пути введения и способа применения различают: таблетки для применения в полости рта, вагинальные таблетки, внутриматочные таблетки, таблетки для имплантации, таблетки для ингаляций.

К таблеткам для применения в полости рта относят таблетки для рассасывания, жевательные, защечные, защечные мукоадгезивные,

подъязычные, диспергируемые в полости рта, а также таблетки-лиофилизат.

Таблетки для рассасывания – таблетки, помещаемые в полость рта для последующего рассасывания обычно с целью оказания местного действия.

Таблетки жевательные – таблетки без оболочки, требующие разжевывания перед проглатыванием.

Таблетки защечные – таблетки, помещаемые в щечный карман с целью оказания системного действия.

Таблетки защечные мукоадгезивные – таблетки, помещаемые на слизистую оболочку щек, обычно содержащие гидрофильные полимеры, прилипающие к слизистой оболочке, с целью оказания системного действия в течение продолжительного периода действия.

Таблетки подъязычные – таблетки, помещаемые под язык с целью оказания системного действия.

Таблетки, диспергируемые в полости рта – таблетки, предназначенные для помещения в полость рта, где они быстро диспергируются до проглатывания.

Таблетки-лиофилизат – твердая лекарственная форма, получаемая путем лиофилизации в виде пористой массы, имеющая форму таблетки и предназначенная для помещения в полость рта, где происходит быстрое высвобождение действующих веществ при контакте со слюной перед проглатыванием.

Таблетки вагинальные – таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой, предназначенные для введения во влагалище, обычно с целью оказания местного действия.

Таблетки вагинальные шипучие – таблетки, предназначенные для введения во влагалище, в состав которых введены органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, реагирующие в его среде с выделением углерода диоксида.

Таблетки внутриматочные – таблетки , предназначенные для введения в полость матки, высвобождающие действующие вещества в течение

длительного периода времени.

Таблетки для имплантации – стерильные таблетки, получаемые путем прессования, предназначенные для имплантации, обычно подкожной, с целью оказания местного или системного действия в течение продолжительного периода действия.

Таблетки для ингаляций – таблетки, образующие пары при добавлении в горячую воду или при помощи соответствующего устройства (например, ингалятора), предназначенные для вдыхания с целью оказания местного действия.

Таблетки могут быть использованы для приготовления других лекарственных форм путем растворения/диспергирования их в соответствующем растворителе. Полученные из таблеток лекарственные формы – капли, растворы, суспензии и др., в свою очередь используют для приема внутрь, наружного, местного, парентерального применения. Для таких таблеток используют термин *«Таблетки для приготовления…»* с указанием наименования получаемой лекарственной формы и пути ее введения (способа применения), например, «таблетки для приготовления раствора для местного применения». Кроме того, выделяют таблетки растворимые, диспергируемые и шипучие.

Таблетки растворимые – таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой, растворяемые в подходящем растворителе перед применением с образованием раствора для приема внутрь.

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

Таблетки шипучие – таблетки без оболочки, в состав которых введены органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, реагирующие в присутствии воды с выделением углерода диоксида, предназначенные для растворения/диспергирования в воде перед приемом внутрь.

По типу высвобождения различают таблетки с обычным и

модифицированным высвобождением.

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

Таблетки кишечнорастворимые – таблетки для приема внутрь с отсроченным высвобождением, покрытые специальной оболочкой или содержащие специальные вещества или полученные с использованием специальной технологии, которые обеспечивают устойчивость в желудочном соке (гастрорезистентность) и обычное высвобождение действующих веществ в кишечном соке. В случае если таблетки покрыты оболочкой, используют термин «*таблетки кишечнорастворимые, покрытые оболочкой».* В случае если таблетки покрыты пленочной оболочкой, используют термин «*таблетки кишечнорастворимые, покрытые пленочной оболочкой».*

Таблетки с пролонгированным высвобождением – таблетки для приема внутрь, покрытые специальной оболочкой или содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ. В случае если таблетки покрыты оболочкой, используют термин «*таблетки с пролонгированным высвобождением, покрытые оболочкой».* В случае если таблетки покрыты пленочной оболочкой, используют термин «*таблетки с пролонгированным высвобождением, покрытые пленочной оболочкой».*

Таблетки кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением – таблетки кишечнорастворимые, покрытые специальной оболочкой или содержащие специальные вспомогательные вещества или полученные по специальной технологии, для замедленного непрерывного высвобождения действующих веществ. В случае если таблетки покрыты оболочкой, используют термин «*таблетки кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением, покрытые оболочкой».* В случае если таблетки покрыты пленочной оболочкой, используют термин «*таблетки кишечнорастворимые*

с пролонгированным высвобождением, покрытые пленочной оболочкой».

Таблетки с модифицированным высвобождением – таблетки для приема внутрь, полученные по специальной технологии, или в состав оболочки и/или содержимого которых входят специальные вспомогательные вещества, для изменения скорости и/или времени и/или места высвобождения действующего вещества. Использование термина «модифицированное высвобождение» возможно лишь в тех случаях, когда неприменимы термины «кишечнорастворимые с пролонгированным высвобождением», «с пролонгированным высвобождением» или «кишечнорастворимые». В случае если таблетки покрыты оболочкой, используют термин *«таблетки с модифицированным высвобождением, покрытые оболочкой».* В случае если таблетки покрыты пленочной оболочкой, используют термин *«таблетки с модифицированным высвобождением, покрытые пленочной оболочкой».*

Упаковка таблеток может быть однодозовой и многодозовой.

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. Таблетки-лиофилизат производят путем лиофилизации жидкостей или гелей, содержащих действующие вещества.

В зависимости от технологии производства, пути введения и способа применения таблеток, физико-химических свойств действующих и вспомогательных веществ, дозировки, скорости и характера высвобождения действующих веществ таблеток, применяют различные вспомогательные вещества в соответствии с их назначением.

Разбавители используют для обеспечения необходимой массы таблетки, если в состав входит малое количество действующего вещества

(или веществ): глюкоза (декстроза), крахмал, кальция гидрофосфат, кальция карбонат, лактозы моногидрат, магния карбонат, сорбит (сорбитол), микрокристаллическая целлюлоза, маннит (маннитол) и др.

Разрыхлители (дезинтегранты) включают в состав таблеток с целью обеспечения их распадаемости. К ним относят 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: крахмальный клейстер, желатин, сахароза, натрия альгинат, гель 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 таблетируемых смесей: 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. Такие вещества 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.

В состав шипучих таблеток входят органические кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты.

В зависимости от состава и способа нанесения оболочки таблеток различают дражированное, пленочное и прессованное покрытие.

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

Таблетки кишечнорастворимые получают путем покрытия таблеток кишечнорастворимой оболочкой или прессованием гранул или частиц, предварительно покрытых устойчивой к желудочному соку оболочкой.

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.

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*, придающие 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 (акации 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, хранении и транспортировании таблеток должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные таблетки производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Таблетки должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Восстановленные лекарственные формы, полученные с использованием таблеток, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных лекарственных форм. В фармакопейной статье или нормативной

документации указывают **«Время растворения/диспергирования»** и, при необходимости, **«Описание»** полученной лекарственной формы.

Таблетки, предназначенные для приготовления капель глазных, должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Таблетки, предназначенные для приготовления растворов или суспензий для парентерального применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Таблетки-лиофилизат должны соответствовать требованиям ОФС «Лиофилизаты».

Таблетки для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Описание. 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.

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. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Истираемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Истираемость таблеток» в рамках контроля технологического

процесса производства таблеток.

Прочность на раздавливание. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Прочность таблеток на раздавливание» 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.

Таблетки кишечнорастворимые, покрытые оболочкой, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, должны выдерживать 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 pH 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

выдерживать испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». В качестве жидкой среды используют воду с температурой от 15 до 25 °С. Таблетки должны распадаться в течение 3 мин.

Таблетки для применения в полости рта (таблетки подъязычные, защечные, для рассасывания) должны выдерживать испытание на распадаемость в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Время распадаемости приводят 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 суппозиториев и вагинальных таблеток». Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, время распадаемости таблеток не должно превышать 30 мин.

Таблетки-лиофилизат. 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. Испытание повторяют на 5 других таблетках. Таблетки удовлетворяют требованиям, если все 6 таблеток распались.

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 в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» согласно указаниям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации нет других указаний, то:

- для таблеток, таблеток, покрытых оболочкой, (1группа) проводят испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ;

- для таблеток кишечнорастворимых, таблеток кишечнорастворимых, покрытых оболочкой, (2группа) проводят испытание, подтверждающее отсроченное высвобождение необходимого количества действующего вещества;

- для таблеток с пролонгированным высвобождением, таблеток с пролонгированным высвобождением, покрытых оболочкой, (3 группа) проводят испытание, подтверждающее замедленное высвобождение действующего вещества.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Дисперсность. Испытание проводят для таблеток диспергируемых. 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 (ОФС «Ситовой анализ»).

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят для таблеток-лиофилизатов обязательно, а также, в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации, в тех случаях, когда содержание воды может влиять на свойства действующего вещества, на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «таблетки» и т.д. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Определение вспомогательных веществ. Испытание проводят для таблеток, в фармакопейных статьях или нормативной документации которых нормируется содержание таких вспомогательных веществ, как тальк, аэросил, кальция стеарат, магния стеарат и др. Определение содержания вспомогательных веществ 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.

Микробиологическая чистота. Все таблетки, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытания проводят для таблеток, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственные средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

На упаковке растворимых, шипучих и диспергируемых таблеток должна быть предупредительная надпись о необходимости предварительного растворения/диспергирования 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, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пластыри трансдермальные **ОФС.1.4.1.0016.15**

Вводится впервые

Пластыри трансдермальные – лекарственная форма для наружного применения, представляющая собой пластырь медицинский, состоящий из нанесенных на подложку матрицы или резервуара, предназначенный для контролируемой доставки действующего вещества (веществ) в системный кровоток путем пассивной диффузии через неповрежденную кожу.

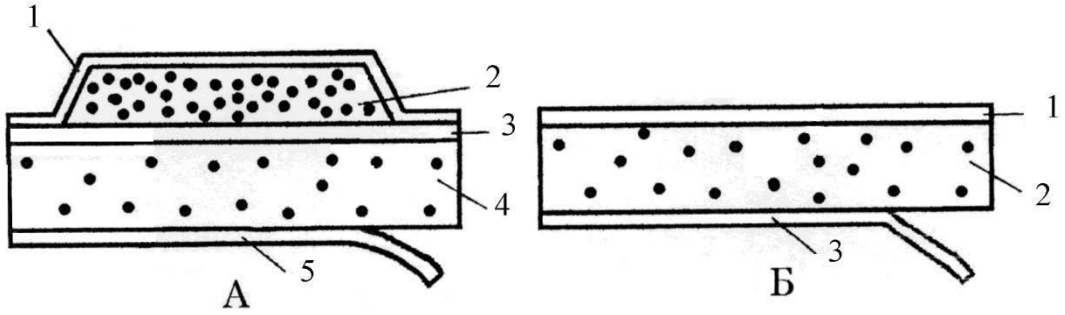
Пластыри трансдермальные могут содержать одно или несколько действующих веществ.

Пластырь трансдермальный 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 пластыря трансдермального.

Различают два основных вида пластырей трансдермальных: резервуарные и матричные (см. рисунок). В резервуарных пластырях трансдермальных (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 пластыри трансдермальные 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 пластырей трансдермальных: 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 пластырь трансдермальный, что облегчает процесс его удаления.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

В качестве вспомогательных веществ, входящих в состав пластырей трансдермальных, могут быть использованы пластификаторы, стабилизаторы, модификаторы скорости высвобождения действующего вещества, усилители проницаемости кожи для действующего вещества, адгезивы, полимеры, сополимеры, растворители, эмульгаторы и другие разрешенные к медицинскому применению вещества.

Вспомогательные вещества не должны обладать местнораздражающим, аллергизирующим и токсическим действием.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании пластырей трансдермальных должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные пластыри трансдермальные производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Пластыри трансдермальные должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы пластыря трансдермального, цвет внешнего покровного слоя, описание матрицы и/или адгезива с указанием геометрических размеров площади подачи (высвобождения) действующего вещества с допустимыми отклонениями.

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

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

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

Микробиологическая чистота. Все пластыри трансдермальные, за

исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные пластыри трансдермальные должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Примечание. Содержание действующего вещества/веществ в пластыре трансдермальном от заявленного не должно превышать ±15 %.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Каждый пластырь трансдермальный, как правило, помещают в индивидуальную первичную упаковку.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». На первичной упаковке указывают название и содержание действующего вещества в пластыре трансдермальном, 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 – жидкая лекарственная форма, представляющая собой гетерогенную двухфазную дисперсную систему с жидкой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой.

Эмульсия, содержащая диспергированные частицы размером менее 1 мкм, представляют собой микрогетерогенную дисперсную систему.

Различают два основных типа эмульсий: «масло в воде» и «вода в масле».

В зависимости от пути введения и способа применения различают эмульсии для приема внутрь, для местного применения, для наружного применения, вагинальные, внутриматочные, ректальные, зубные, для гастроэнтерального введения, для промывания слухового прохода, для ингаляций, для парентерального применения, для применения в форме капель глазных.

Эмульсии бывают дозированные и недозированные.

Упаковка эмульсий может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Эмульсии получают диспергированием эмульгатора с эмульгируемой жидкостью и дисперсионной средой.

При получении эмульсий используют миндальное, персиковое, оливковое, подсолнечное, касторовое, вазелиновое и эфирные масла, а также рыбий жир и другие несмешивающиеся с водой жидкости.

Эмульгаторы вводят в состав эмульсий для обеспечения устойчивости.

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

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

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

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.

В случае необходимости в состав эмульсии вводят антимикробные консерванты.

Эмульсии могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными непосредственно перед применением в виде восстановленной лекарственной формы из лиофилизатов, предназначенных для получения эмульсии путем диспергирования в соответствующем растворителе.

Эмульсии также могут быть получены в виде разведенной (разбавленной) лекарственной формы из концентратов, предназначенных для получения эмульсии после их разведения (разбавления) в соответствующем растворителе до требуемой концентрации.

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

Стерильные эмульсии производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста

микроорганизмов в соответствии с ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Эмульсии должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

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, предназначенные для применения в форме капель глазных должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Лиофилизаты и концентраты, предназначенные для получения эмульсий, должны соответствовать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Лиофилизаты» или ОФС «Концентраты».

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

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

Вязкость. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, одним из методов, описанных в

ОФС «Плотность». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Размер частиц. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, методом оптической микроскопии в соответствии с требованиями ОФС «Оптическая микроскопия» или в соответствии с методикой, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации. Нормативные требования к размеру частиц (размеру капель) указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Испытание проводят для дозированных эмульсий и эмульсий в однодозовых индивидуальных упаковках в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Микробиологическая чистота. Все эмульсии, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для эмульсий, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

Извлекаемый объем. Испытание проводят для эмульсий для приема внутрь в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем». Испытание не применяют для дозированных эмульсий и эмульсий в однодозовых индивидуальных упаковках, если проводят испытание на однородность дозирования.

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят для всех эмульсий, за исключением эмульсий для приема внутрь, в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовая упаковка эмульсий для приема внутрь может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

Упаковка эмульсий для вагинального, ректального, внутриматочного введения, а также, при необходимости, упаковка эмульсий для промывания слухового прохода и др., должна быть приспособлена для соответствующего введения или снабжена подходящей насадкой, аппликатором.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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.

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 укупорен 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:

$$m = \frac{A \cdot B}{Б} \quad ,$$

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

A – прописанное количество лекарственного растительного сырья, г;

$Б$ – 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 укупоренной 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 сырью (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 аптечной организации, а также при технологическом процессе производства лекарственных растительных препаратов.

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

pH водного извлечения. Испытание проводят потенциометрическим методом 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 в течение 2 ч при температуре (102,5 ± 2,5) ^{o}C, затем охлаждают в эксикаторе над кальция хлоридом безводным и взвешивают.

УПАКОВКА

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

МАРКИРОВКА

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

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.

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, полученные из лекарственного растительного сырья (высушенного или свежесобранного), а также из сырья животного происхождения без удаления экстрагента.

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

В зависимости от пути введения и способа применения различают настойки для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения, для ингаляций.

Термин *«настойка»* используют для настоек, предназначенных для приема внутрь, как правило, после разведения.

Настойка для ингаляций – настойка, образующая пары при добавлении в горячую воду или при помощи соответствующего устройства (например, ингалятора и др.), предназначенные для вдыхания с целью оказания местного действия.

Настойка для местного применения – настойка, предназначенная для местного применения (в том числе после разведения).

Настойка для наружного применения – настойка, предназначенная для наружного применения (в том числе после разведения).

Настойки могут использоваться как лекарственные растительные препараты, а также в качестве фармацевтических субстанций входить в состав других лекарственных препаратов, представляющих собой, например, жидкие лекарственные формы, включая капли для приема внутрь, эликсиры и др.

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 некоторых настоек, главным образом комплексных, допускается образование незначительного осадка балластных веществ, при условии отсутствия в нем биологически активных веществ, по которым осуществляется стандартизация.

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

ИСПЫТАНИЯ

Настойки должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Настойки, как правило, представляют собой прозрачную окрашенную жидкость, по внешнему виду и запаху соответствующую требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Допускается наличие опалесценции, взвеси, в ряде случаев, особенно в процессе хранения, возможно образование незначительного осадка, если это не влияет на эффективность и безопасность лекарственного средства.

Плотность. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статьей или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и нормативными требованиями по содержанию спирта этилового, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Метанол и 2-пропанол. Испытание проводят методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» на стадии производственного процесса. Если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, допускается содержание не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола.

Сухой остаток. 5,0 мл настойки помещают в предварительно высушенную при температуре 100-105 ^{o}C 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 ± 2,5) ^{o}C, 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. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

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

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» в упаковке, обеспечивающей защиту от света, если не указано другое в фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для настоек, в которых возможно образование опалесценции или незначительного осадка (при хранении), должна быть предусмотрена предупредительная надпись «Перед употреблением взбалтывать».

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». 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.

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, обусловливающих 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 валидированными 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.

Экстракты	**ОФС.1.4.1.0021.15** **Взамен ГФ X, ст. 253, ст. ГФ XI, вып. 2**

Экстракты – лекарственная форма, представляющая собой концентрированное извлечение из лекарственного растительного сырья, реже из сырья животного происхождения.

По консистенции различают:

- *экстракты сухие (Extracta sicca)* – порошкообразные массы, обладающие свойством сыпучести, с содержанием влаги не более 5 %;

- *экстракты густые (Extracta spissa)* – вязкие массы с содержанием влаги не более 25 %;

- *экстракты жидкие (Extracta fluida*) – 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. Экстракты-концентраты преимущественно используют для получения настоев и отваров, заменяя в указанных соотношениях лекарственное растительное сырье.

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 (четыреххлористого углерода, дихлорэтана и др.);

- экстракты, полученные последовательным экстрагированием лекарственного растительного сырья экстрагентами, в том числе различной полярности.

Экстракты могут быть получены на основе одного вида лекарственного растительного сырья (простые) и на основе смеси нескольких видов лекарственного растительного сырья (сложные, комплексные).

В зависимости от пути введения и способа применения различают экстракты для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения.

Экстракт для приема внутрь – экстракт, предназначенный для приема внутрь (в том числе после разведения).

Экстракт для наружного применения – экстракт, предназначенный для наружного применения (в том числе после разведения).

Экстракт для местного применения – экстракт, предназначенный для местного применения (в том числе после разведения).

Экстракты могут использоваться как лекарственные растительные препараты, а также в качестве фармацевтических субстанций входить в состав других лекарственных препаратов, представляющих собой различные лекарственные формы, например, таблетки, капсулы, эликсиры, суппозитории, капли для приема внутрь и др.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Экстракты могут быть получены методами перколяции, реперколяции, мацерации, циркуляционной экстракции и другими подходящими валидированными методами.

Лекарственное растительное сырье, используемое для получения экстрактов, должно отвечать требованиям соответствующих фармакопейных статей или нормативной документации.

Вспомогательные вещества, используемые в качестве экстргентов, должны быть разрешены к медицинскому применению.

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 жидкие после завершения процесса экстрагирования следует обязательно выдерживать при температуре 8-10 °С в течение не менее 2 сут. для осаждения балластных веществ, отделяемых фильтрованием, и получения прозрачной жидкости. В процессе хранения экстрактов жидких допускается образование незначительного осадка балластных веществ при условии отсутствия в нем биологически активных веществ.

При получении экстрактов сухих и густых их освобождают от балластных веществ добавлением к полученной вытяжке спирта этилового, адсорбентов, кипячением вытяжки и другими способами с последующим фильтрованием.

В случае экстрактов густых очищенные извлечения сгущают выпариванием под вакуумом до требуемой консистенции.

Экстракты сухие получают высушиванием экстрактов густых или непосредственно из очищенной вытяжки с использованием методов, обеспечивающих максимальное сохранение действующих веществ: распыление, лиофилизация, сублимация и др.

При производстве экстрактов-концентратов предварительно полученные экстракты различной консистенции стандартизуют до требуемого содержания действующих веществ, как правило, путем разбавления вспомогательными веществами, например, декстрином и др.

Гигроскопичность экстрактов сухих уменьшают добавлением лактозы, аэросила и других вспомогательных веществ.

При получении лекарственных препаратов с использованием экстрактов густых разрешено применение растворов экстрактов густых

(Extracta soluta) 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. Растворы экстрактов густых применяют в двойном количестве, срок их хранения не должен превышать 15 сут.

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

ИСПЫТАНИЯ

Экстракты должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Указывают консистенцию, цвет, запах (при наличии) экстракта. Для жидких экстрактов, при необходимости, отмечают наличие опалесценции, возможность образования осадка при хранении и др.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят для экстрактов сухих и густых в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Испытание проводят для спиртсодержащих экстрактов в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и нормативными требованиями по содержанию спирта этилового, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Насыпной объем. Испытание проводят для сухих экстрактов в соответствии с требованиями раздела «Определение насыпного объема» ОФС «Степень сыпучести порошков» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Гранулометрический состав. Если указано в фармакопейной статье или нормативной документации испытание проводят для сухих экстракты контролируют в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Тяжелые металлы. К 1 мл жидкого экстракта или 1 г густого или сухого экстракта 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 200 мл; 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытания на тяжелые металлы (ОФС «Тяжелые металлы», метод 1). Все экстракты должны выдерживать требования по содержанию тяжелых металлов – не более 0,01 %, если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сухой остаток. Испытание проводят для жидких экстрактов по следующей методике: 5,0 мл жидкого экстракта помещают в предварительно высушенную при температуре 100-105 ^{o}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 3 ч при температуре (102,5 ± 2,5) ^{o}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.

Кислотное число, перекисное число, йодное число, число омыления. Если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят для масляных экстрактов в соответствии с требованиями соответствующих ОФС: ОФС «Кислотное число»,

ОФС «Перекисное число», ОФС «Йодное число»; ОФС «Число омыления» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят для масляных экстрактов в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворимость. Если указано в фармакопейной статьей или нормативной документацией испытание проводят для масляных экстрактов в соответствии с требованиями ОФС «Растворимость» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Показатель преломления. Если указано в фармакопейной статьей или нормативной документацией испытание проводят для масляных экстрактов в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Остаточные органические растворители. Испытание проводят для экстрактов, при производстве которых используют органические растворители в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Метанол и 2-пропанол. Если указано в фармакопейной статье или нормативной документации испытание проводят для жидких экстрактов в соответствии с ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» на стадии производственного процесса. Если другое не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, допускается содержание не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Масса или объем содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки, определяя массу экстрактов сухих и густых и определяя объем экстрактов жидких.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» в упаковке, обеспечивающей защиту от света, если не указано другое в фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для экстрактов жидких, в которых возможно образование опалесценции или незначительного осадка (при хранении), 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 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 прессованного 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.

Гранулы резано-прессованные могут быть дозированными и недозированными.

Упаковка дозированных гранул резано-прессованных может быть однодозовой и многодозовой.

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/см^2) 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 общих фармакопейных статей.

Описание. Указывают форму, цвет, запах гранул, при необходимости 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 другое не указано в фармакопейной статье или нормативной

документации.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Распадаемость. 10-12 гранул резано-прессованных 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 указывают в фармакопейной статье или нормативном документе, 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 «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 иметь указание «Продукция прошла радиационный контроль».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Газы медицинские	**ОФС.1.4.1.0023.18**
	Вводится впервые

Газы медицинские – лекарственная форма, представляющая собой любое вещество или смесь веществ, газообразных при нормальном атмосферном давлении и комнатной температуре.

В зависимости от созданных температурных условий и давления различают газы медицинские криогенные, сжатые и сжиженные.

Газ медицинский криогенный – газ медицинский, сжижающийся при давлении 101,3 кПа и температуре ниже минус 150 °С.

Газ медицинский сжатый – газ медицинский, сохраняющий газообразное состояние при наполнении под давлением при температуре минус 50 °С.

Газ медицинский сжиженный – газ медицинский, находящийся в двухфазном состоянии (газ над жидкостью) при наполнении под давлением при температуре минус 50 °С.

Как лекарственная форма, газы медицинские могут быть предназначены для оказания местного и/или системного действия на организм человека и по способу применения могут быть использованы для приема внутрь, для наружного, местного или ингаляционного применения.

Вместе с тем, газы медицинские рассматривают и как лекарственные средства, при этом газы медицинские сжиженные представляют собой фармацевтические субстанции, которые используют для получения лекарственных препаратов в виде газов медицинских сжатых, выпускаемых в виде лекарственных форм «газ медицинский» или в виде других лекарственных форм, например, аэрозолей, пен.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Газы медицинские, рассматриваемые как фармацевтические субстанции или вспомогательные вещества, могут быть произведены путем химического синтеза или получены из природных источников с последующей их очисткой, при необходимости.

Производство газов медицинских должно быть организовано в промышленных условиях в соответствии с правилами надлежащей производственной практики, требованиями действующих в Российской Федерации нормативных правовых актов к данному виду опасного производства. Процесс производства газов медицинских должен быть валидирован.

Исходные материалы, вспомогательные вещества, используемые в процессе производства газов медицинских, включая воздух, природные газы, воду и др., а также упаковка (баллоны, цистерны, резервуары и другие криогенные емкости) должны соответствовать установленным требованиям к их качеству, включая требования к микробиологической чистоте.

Помещения, в которых выполняются операции по производству, проведению испытаний и хранению газов медицинских, должны иметь достаточную площадь для исключения возможности их перепутывания.

Производство газов медицинских, как правило, осуществляют в закрытом оборудовании. В связи с этим, риск загрязнения данной продукции из окружающей среды минимален, но существует риск перекрестного загрязнения другими газами, в том числе немедицинского применения.

При производстве смеси газов медицинских путем смешивания двух или более различных газов (в линии для наполнения или непосредственно в баллонах) необходимо использовать валидированный метод смешивания, гарантирующий, что процесс осуществлен в полном соответствии с общепринятыми для этого правилами и гомогенность полученной смеси газов медицинских обеспечена.

Наполнение газом медицинским баллонов или других криогенных

емкостей осуществляется через распределительный коллектор, предназначенный только для одного определенного газа медицинского или определенной смеси газов.

Газы медицинские сжиженные, представляющие собой фармацевтические субстанции, помещают, как правило, в цистерны или резервуары.

Лекарственные препараты, представляющие собой газы медицинские сжатые помещают в баллоны газовые стальные различной емкости.

Полученные промышленным способ газы медицинские могут быть использованы непосредственно в том виде, в котором они выпущены, а также могут быть использованы для последующего изготовления газо-воздушной смеси в условиях медицинского стационара или могут быть расфасованы (например, в кислородные подушки) в условиях аптечной или медицинской организации.

ИСПЫТАНИЯ

Газы медицинские должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы, а также испытания, характерные для газов медицинских, рассматриваемых как лекарственное средство.

При подготовке к испытаниям газов медицинских должна быть утверждена процедура отбора проб, включая отбор проб в ходе технологического процесса производства, в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб»; порядок отбора проб необходимо указать в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для оценки качества газов медицинских, как лекарственных средств применяют универсальные испытания, такие как описание, подлинность, чистота, количественное определение.

Описание. Приводят физико-химические (агрегатное состояние, отношение к воспламенению, горению и др.), органолептические свойства (цвет, запах) газа медицинского и, при необходимости, в фармакопейной

статье или нормативной документации приводят методику определения.

Подлинность. Выбор испытаний зависит от вида газа/смеси газов. Для испытаний применяют наиболее специфические методы анализа, включая химические (качественные реакции), физико-химические (ОФС«Газовая хроматография»; ОФС«Спектрометрия в инфракрасной области» и др.), визуальные (по тлеющей лучине) и другие методы анализа в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Чистота. В газах медицинских определяют наличие примесей и их содержание.

Например, в кислороде (как в сжатом, так и в сжиженном газе) определяют содержание примеси углерода диоксида, углерода монооксида, газообразных кислот и оснований, озона и других газов-окислителей, водяных паров. В сжиженном кислороде также контролируют содержание ацетилена, масла, механических включений.

В динитрогене оксиде (азота закиси газе сжатом) контролируют содержание примеси углерода диоксида, углерода монооксида, азота монооксида и азота диоксида, аммиака, галогенов и сероводорода, водяные пары, а также кислотность и щелочность.

В ксеноне определяют содержание примеси кислорода, азота, криптона, углерода диоксида, углерода монооксида, метана, водяных паров.

Возможно определение других примесей, если это предусмотрено фармакопейной статьей или нормативной документацией.

Содержание примесей посторонних газов, как правило, определяют методом газовой хроматографии в соответствии с требованиями ОФС «Газовая хроматография» или с использованием индикаторных (детекторных) трубок или другими методами в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

Количественное определение. Выбор испытаний зависит от вида газа/смеси газов. Для испытаний может быть использован метод газовой хроматографии в соответствии с требованиями ОФС «Газовая

хроматография», а также другие методы (парамагнитного анализа, поглотительный метод и др.), регламентированные фармакопейной статьей или нормативной документацией, в которых также приведены методики и нормативные требования количественного определения газов медицинских. В отдельных случаях для количественного определения может быть использован расчетный метод.

Следующие испытания проводят для оценки качества газов медицинских как лекарственной формы лекарственных препаратов.

Объем содержимого упаковки. Испытание проводят для газов медицинских сжатых в баллонах расчетным методом на основании измерения давления газа медицинского в упаковке с учетом температуры в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Давление газа в упаковке. Испытание проводят, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, для газов медицинских сжатых в баллонах при проведении технологического процесса производства. Методика определения и нормативные требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Герметичность упаковки. Испытание проводят, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации, для газов медицинских сжатых в баллонах при проведении технологического процесса производства. Методика определения и нормативные требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Баллоны для газов медицинских должны быть опломбированы для контроля первого вскрытия; для защиты от загрязнения на баллоны рекомендуется устанавливать защитные колпачки.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и требованиями действующих в Российской Федерации нормативных правовых актов по маркировке опасных веществ.

Баллоны для газов медицинских должны быть окрашены в соответствующий цвет и иметь наименование (надпись) установленного цвета в соответствии с требованиями нормативных правовых актов.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и в соответствии с требованиями, установленными в Российской Федерации для данного вида продукции.

Баллоны, наполненные газом медицинским и газовыми смесями, хранят в специальных складских помещениях или на открытых площадках под навесом, защищенных от воздействия экстремальных температур, атмосферных осадков и прямых солнечных лучей, вдали от источников отопления и открытого огня.

Зоны хранения должны быть чистыми, сухими, хорошо проветриваемыми, в них не должны храниться горючие материалы.

Во время транспортирования газовые баллоны (контейнеры) должны быть защищены от неблагоприятных погодных условий. Для газовых смесей, в которых при замораживании происходит разделение фаз, должны соблюдаться особые условия хранения и транспортирования.

Губки лекарственные **ОФС.1.4.1.0024.18**

Вводится впервые

Губки лекарственные – стерильная дозированная лекарственная форма, представляющая собой пористый абсорбирующий материал, пропитанный действующим веществом (веществами) или являющийся им, с добавлением или без добавления вспомогательных веществ, предназначенная для наружного или местного применения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Производство губок лекарственных включает, как правило, процесс приготовления раствора соединения, образующего основу губки лекарственной, и введения в него действующего вещества (веществ) и вспомогательных веществ с последующей сублимационной сушкой полученной композиции и приданием ей необходимой формы и размеров.

В качестве основы для производства губок лекарственных обычно используют природные соединения (желатин, коллаген, соли альгиновой кислоты и др.), представляющие собой, после специальной обработки, пористый абсорбирующий материал.

Как правило, в лекарственной форме «Губки лекарственные» выпускают гемостатические, антисептические, дерматопротекторные, стимулирующие репарацию тканей и др. лекарственные препараты.

При производстве стерильных губок лекарственных используют методы стерилизации в соответствии с ОФС «Стерилизация».

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании стерильных губок лекарственных предпринимают меры, обеспечивающие их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Губки лекарственные должны соответствовать общим требованиям

ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Губки лекарственные, как правило, представляют собой пластины или листы определенной формы и размера.

Приводят описание структуры материала губки лекарственной, ее формы и цвета (например, листы белого цвета пористой структуры или сухая пористая масса желтого цвета в форме пластин), указывают запах – при наличии. При необходимости, описывают характер поверхности губки (например, рельефная, гладкая и др.).

pH водного извлечения. Испытание проводят потенциометрически в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Значение pH водного извлечения должно быть в диапазоне от 4,5 до 7,5, если иное не обосновано и не указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Методику пробоподготовки образца лекарственного препарата для проведения испытания и нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Абсорбирующая способность. Испытание проводят для губок лекарственных в лекарственных препаратах, предназначенных для поглощения экссудатов и других выделений из раневых поверхностей. Методику испытания и нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Показатели «Потеря в массе при высушивании» и «Вода» могут быть альтернативными, кроме случая, когда определение показателя «Потеря в массе при высушивании» необходимо для контроля содержания остаточных органических растворителей.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с

требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации.

Определение гемостатической активности. Испытание проводят для губок лекарственных в гемостатических лекарственных препаратах. Методику испытания и нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Стерильность. Губки лекарственные должны быть стерильны и должны соответствовать требованиям ОФС «Стерильность».

Примечание. Как правило, при количественном определении содержание действующего вещества выражают в мг/г губки лекарственной.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Каждую губку лекарственную упаковывают герметично в индивидуальную первичную упаковку, обеспечивающую ее стерильность в течение всего срока годности.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом защищенном от света месте, при температуре, обеспечивающей сохранность действующих и вспомогательных веществ. Как правило, эта температура не должна превышать 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Драже **ОФС.1.4.1.0025.18**

Взамен ГФ X, ст.235

Драже – твердая дозированная лекарственная форма для приема внутрь, получаемая путем послойного нанесения действующих веществ в смеси со вспомогательными веществами на гранулы, полученные из индифферентных вспомогательных веществ.

Масса драже, как правило, колеблется в пределах от 0,1 до 0,5 г, в отдельных случаях – до 1,0 г.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Производство драже осуществляется в дражировочных котлах с использованием технологии, заключающейся в многократном послойном нанесении действующего вещества (веществ) в смеси со вспомогательными веществами на ядро, представляющее собой гранулу, полученную из подходящих индифферентных вспомогательных веществ.

В качестве вспомогательных веществ при производстве драже используют сахар, крахмал, магния карбоната гидрат, этилцеллюлозу, ацетилцеллюлозу, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, пшеничную муку, гидрогенизированные жиры, стеариновую кислоту, тальк, корригенты вкуса и запаха, красители, лаки и др.

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

ИСПЫТАНИЯ

Драже должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для

данной лекарственной формы.

Описание. Драже имеет правильную шарообразную форму и гладкую поверхность. В отдельных случаях наружный слой драже может быть окрашен.

Приводят описание формы и цвета драже. Поверхность драже должна быть гладкой, ровной, однородной по окраске, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, в качестве жидкой среды используют воду. Драже должны распадаться в течение 30 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» согласно указаниям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации, в тех случаях, когда содержание воды может влиять на свойства действующего вещества, на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «драже» и т.д. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или

нормативной документации.

Определение вспомогательных веществ. Испытание проводят для драже, в фармакопейных статьях или нормативной документации которых нормируется содержание таких вспомогательных веществ, как тальк, аэросил, кальция стеарат, магния стеарат и др.

Определение содержания вспомогательных веществ проводят в соответствии с методикой, приведенной в ОФС «Таблетки», раздел «Испытания», показатель «Определение вспомогательных веществ».

Количество талька должно быть не более 3 %, стеариновой кислоты – не более 1 % от массы драже.

Однородность дозирования. Драже должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят также, как для лекарственной формы «Таблетки». Допускается отклонение в содержании действующего вещества в одном драже ± 15 % от средней массы, если иное не обосновано и не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Драже должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом и, при необходимости, защищенном от света месте при температуре не выше 25°С, если нет других

указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Имплантаты **ОФС.1.4.1.0026.18**

Вводится впервые

Имплантаты – стерильная твердая лекарственная форма, имеющая подходящие для введения в ткани тела размеры и форму, предназначенная для имплантации и высвобождающая действующее вещество (вещества) в течение длительного периода времени. Как правило, вводится подкожно, в иных случаях указывается путь введения.

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на таблетки для имплантации.

Таблетки для имплантации должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

По пути введения и способу применения, кроме имплантатов для подкожного введения, различают также имплантаты глазные, имплантаты для внутримышечного введения, а также имплантаты для введения в различные органы.

Для имплантатов, предназначенных для подкожного введения, используют термин *«имплантат».*

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

Имплантат интравитреальный – имплантат глазной, предназначенный для введения в заднюю камеру глаза.

По типу высвобождения имплантаты относят к лекарственным формам с модифицированным, как правило пролонгированным, высвобождением.

Имплантаты могут быть покрыты оболочкой.

Имплантаты могут быть произведены на основе биодеградируемых/растворимых материалов *(биодеградируемые имплантаты)* и на основе небиодеградируемых материалов *(небиодеградируемые имплантаты).*

Биодеградируемые имплантаты не требуют удаления из места имплантации при завершении лечения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Имплантаты представляют собой полимерную основу (матрикс) с равномерно распределенным в ней действующим веществом (веществами), которое способно в течение определенного времени высвобождаться из основы в месте имплантации.

Биодеградируемыми называются полимерные материалы, разрушающиеся в результате естественных (микробиологических, биохимических) процессов, протекающих в организме. Длительность высвобождения действующего вещества из биодеградируемого имплантата может варьировать от 35 дней до 12 месяцев. На скорость высвобождения влияют размер частиц и растворимость действующего вещества (веществ), площадь поверхности имплантата, скорость образования эрозии полимера и др.

Биодеградируемые имплантаты, как правило, производят из синтетических алифатических полиэфиров – полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты, сополимеров полигликолевой и полимолочной кислот; поликапролактона, полипропилена фумарата и др. Наиболее часто в качестве биодеградируемого полимера для производства имплантатов используют сополимер молочной и гликолевой кислот (полилактид-ко-гликолид).

Небиодеградируемые имплантаты должны быть удалены после завершения периода высвобождения действующего вещества для предотвращения их фиброзирования и инкапсулирования в местах имплантации, например, в полости глаза.

В состав небиодеградируемых имплантатов могут входить поливиниловый спирт, этилвинилацетат, полибутилметилакрилат, полиэтилентерефталат, силикон и др.

Полимерные имплантаты цилиндрической формы, как правило, получают методом экструзии расплава смеси действующего вещества (веществ) и полимера.

Также, имплантаты могут быть произведены путем прямого прессования действующего вещества (веществ) с полимерным носителем.

Имплантаты могут быть покрыты оболочкой, обеспечивающей необходимую скорость высвобождения действующего вещества из полимерной основы.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании имплантатов предпринимают меры, обеспечивающие их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Как правило, стерильность имплантатов обеспечивают финишной стерилизацией или организацией асептических условий производства в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Имплантаты должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы», выдерживать испытания, предъявляемые к лекарственным формам для парентерального применения в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», а также выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета имплантата. Если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, для имплантатов, покрытых оболочкой, приводят определение ее толщины на поперечном разрезе имплантата.

Размеры имплантата. Определяют геометрические размеры (например, диаметр, длину и др.) имплантата в мм путем измерения микрометром. Количество имплантатов для испытания и допустимые

отклонения размеров имплантата приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с методикой и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Определяют количество действующего вещества, которое должно высвободится из имплантата в среду растворения за определенный промежуток времени.

Вода или Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации в тех случаях, когда содержание воды может влиять на физико-химические свойства имплантата, биодоступность действующего вещества (веществ), на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «имплантаты» и т.д. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды» или ОФС «Потеря в массе при высушивании». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Показатели «Потеря в массе при высушивании» и «Вода» могут быть альтернативными, кроме случая, когда определение потери в массе при высушивании необходимо для контроля содержания остаточных органических растворителей.

Однородность дозирования. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Видимые механические включения. Испытание проводят для биодеградируемых имплантатов в зависимости от места их имплантации

(например, для глазных имплантатов), в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Бактериальные эндотоксины или Пирогенность. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» или ОФС «Пирогенность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Стерильность. Имплантаты должны быть стерильны и должны соответствовать требованиям ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Имплантаты упаковывают в индивидуальные стерильные упаковки.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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 не выше 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капли	**ОФС.1.4.1.0027.18** **Вводится впервые**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на капли глазные и капли для ингаляций.

Капли глазные должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Капли для ингаляций должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Капли – жидкая лекарственная форма, представляющая собой раствор, эмульсию или суспензию одного или нескольких действующих веществ в соответствующем растворителе и дозируемая каплями с помощью специального приспособления (капельница, пипетка и др.).

В зависимости от пути введения и способа применения различают капли для приема внутрь, для местного применения, для применения в полости рта, назальные, ушные.

Капли для приема внутрь – капли, предназначенные для приема внутрь, как правило, после разведения.

Капли для местного применения – капли, предназначенные для местного применения.

Капли назальные – капли, предназначенные для инстилляции в полость носа с целью оказания местного или системного действия.

Капли ушные – капли, предназначенные для инстилляции в наружный слуховой проход.

В ряде случаев капли назальные и капли ушные могут быть одновременно предназначены и для офтальмологического применения: *капли*

глазные и назальные, *капли глазные и ушные*, *капли глазные, назальные и ушные*, а также могут быть *капли назальные и ушные.*

К каплям для применения в полости рта относят капли для нанесения на слизистую оболочку полости рта, капли зубные, капли подъязычные.

Капли для нанесения на слизистую оболочку полости рта – капли, предназначенные для нанесения на слизистую оболочку полости рта путем инстилляции в полость рта или на определенную часть полости рта, за исключением подъязычного пространства.

Капли зубные – капли, предназначенные для нанесения на зубы или десны с целью оказания местного действия.

Капли подъязычные – капли, предназначенные для инстилляции под язык с целью оказания системного действия.

По типу дисперсной системы капли могут быть гомогенными (капли-растворы), гетерогенными (капли-суспензии, капли-эмульсии) и комбинированными.

Капли, представляющие собой растворы, могут быть водными и неводными (спиртовыми, масляными и др.).

Упаковка капель может быть однодозовой и многодозовой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

В зависимости от типа дисперсной системы капли могут быть получены растворением или диспергированием действующего вещества (веществ) в соответствующем растворителе (растворителях) или дисперсионной среде.

В качестве *растворителя* или *дисперсионной среды* используют воду очищенную или воду для инъекций, спирт этиловый различной концентрации (30 %, 40 %, 70 %, 95 %, 96 % и др.), масла (минеральные, жирные растительные, эфирные), глицерин. Из жирных растительных масел используют подсолнечное, соевое, оливковое масло; из минеральных масел – вазелиновое; из эфирных масел – анисовое, эвкалиптовое, мятное, масло

сосны обыкновенной и др. В качестве растворителей также могут быть использованы настойки, жидкие экстракты.

В качестве *вспомогательных веществ* при получении капель могут быть использованы подходящие антимикробные консерванты, буферные растворы, сорастворители, стабилизаторы, антиоксиданты, ароматизаторы, пролонгаторы, корригенты и другие вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению.

При разработке состава капель необходимо учитывать физико-химические свойства действующих и вспомогательных веществ, их совместимость, особенности пути введения капель и др. Например, вещества, входящие в состав ушных капель не должны оказывать повреждающего давления на барабанную перепонку; назальные капли, представляющие собой водные растворы, как правило, должны быть изотоничны и т.д.

Капли, представляющие собой суспензии или эмульсии, для обеспечения корректной их дозировки должны быть достаточно стабильными, легко диспергироваться при встряхивании.

Капли могут быть выпущены готовыми к применению или быть приготовленными непосредственно перед применением в виде восстановленных лекарственных форм из гранул, порошков, таблеток или лиофилизатов, предназначенных для получения капель путем их растворения или диспергирования в соответствующем растворителе.

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

Стерильные капли производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в соответствии с ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Капли должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Капли, представляющие собой водные и неводные растворы, должны соответствовать требованиям ОФС «Растворы».

Капли, представляющие собой суспензии, должны соответствовать требованиям ОФС «Суспензии».

Капли, представляющие собой эмульсии, должны соответствовать требованиям ОФС «Эмульсии».

Капли ушные и капли назальные, предназначенные также и для офтальмологического применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Порошки, таблетки, гранулы и лиофилизаты для приготовления капель должны отвечать требованиям соответствующих ОФС: ОФС «Порошки», ОФС «Таблетки», ОФС Гранулы» и ОФС «Лиофилизаты».

Описание. Капли могут представлять собой прозрачный раствор или жидкость, однородную после взбалтывания. Приводят описание капель с указанием прозрачности или мутности, цвета, запаха – при наличии.

Прозрачность. Испытание проводят для стерильных капель, капель для приема внутрь, капель для местного применения, представляющих собой растворы, для остальных капель – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Испытание проводят для стерильных капель, капель для приема внутрь, капель для местного применения, представляющих собой растворы, для остальных капель – при соответствующем указании в фармакопейной статьи или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей».

Доза и однородность дозирования. Испытание проводят для капель, предназначенных для приема внутрь. Количество капель, соответствующее одной дозе, с помощью мерного или дозирующего устройства помещают в мерный цилиндр. Скорость капания не должна превышать 2 кап/сек. Жидкость взвешивают, прибавляют еще одну дозу и вновь взвешивают; повторное прибавление с последующим взвешиванием проводят до тех пор, пока не будет взвешено 10 доз. Определяют среднюю массу дозы.

Масса ни одной дозы не должна отклоняться более чем на 10 % от средней массы. Суммарная масса 10 доз не должна отличаться более чем на 15 % от номинальной массы 10 доз.

При необходимости, измеряют общий объем 10 доз. Объем не должен отличаться более чем на 15 % от номинального объема 10 доз.

Микробиологическая чистота. Все капли, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для капель, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Капли могут быть выпущены в однодозовых и многодозовых упаковках объемом 3-30 мл.

Упаковка капель может представлять собой флакон-капельницу или может быть снабжена специальным приспособлением – средством дозирования каплями в виде вставки-капельницы, крышки-капельницы, насадки-дозатора, пипетки и др.

Стерильные капли выпускают в стерильных однодозовых упаковках с контролем первого вскрытия.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Маркировка капель для приема внутрь должна содержать информацию о количестве капель в 1 мл или 1 г лекарственного препарата.

Для капель, представляющих собой эмульсии или суспензии, 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.

Карандаши лекарственные	**ОФС.1.4.1.0028.18** **Вводится впервые**

Карандаш лекарственный – твердая лекарственная форма в виде карандаша цилиндрической или конической формы с закругленным концом, предназначенная для наружного применения с целью оказания местного действия и состоящая либо только из действующих веществ (одного или нескольких), либо представленная подходящей основой, в которой равномерно распределены действующие вещества.

В зависимости от свойств действующего вещества оно может быть введено в основу в виде раствора, эмульсии или суспензии.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Карандаши лекарственные могут быть получены методом выливания и прессования, реже методами выкатывания и погружения.

Метод прессования может использоваться только для производства карандашей из масс, обладающих достаточной пластичностью.

Выливание может быть использовано в технологии карандашей лекарственных, полученных на различных основах.

Как правило, метод выкатывания может быть использован для изготовления карандашей в аптечных учреждениях.

Метод погружения заключается в погружении в расплавленную основу действующих и вспомогательных веществ с использованием для этих целей специальных форм.

В зависимости от способа получения карандаши лекарственные могут иметь вид цилиндрических палочек или сферических конусов, округло заост-

ренных с одного конца.

Основа карандаша лекарственного должна обеспечивать определенную форму лекарственного препарата, оптимальное высвобождение действующих веществ, достаточную твердость и легкость нанесения.

В качестве формообразующих веществ наиболее часто используют парафин, пчелиный воск, масло какао, полиэтиленгликоль. В качестве пластифицирующих добавок и для улучшения биодоступности действующих веществ в состав карандашей лекарственных включают пропиленгликоль, масла растительные, твин-80, лецитин и другие соединения.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании карандашей лекарственных предпринимают меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание формы и цвета карандаша, указывают запах при наличии. Поверхность карандаша должна быть гладкой, однородной, если не обосновано иное. Указывают вид на поперечном срезе.

Размер частиц. В карандашах лекарственных, содержащих компоненты в виде твердой дисперсной фазы (гетерогенных системах), контролируют размер частиц. Как правило, размер частиц составляет не более 100 мкм. Определение проводят методом оптической микроскопии (ОФС «Оптическая микроскопия»).

Масса содержимого упаковки. Определяют массу содержимого упаковки в соответствии с ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В разделе «Упаковка» указывают размеры карандаша в мм, помещаемого в первичную упаковку.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транс-

портирование лекарственных средств».

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 не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Концентраты	**ОФС.1.4.1.0029.18** **Вводится впервые**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи не распространяются на экстракты-концентраты.

Экстракты-концентраты должны соответствовать требованиям ОФС «Экстракты».

Концентраты – жидкая лекарственная форма, предназначенная для применения после разбавления (разведения) в соответствующем растворителе до требуемой концентрации.

Концентраты могут содержать одно или несколько действующих веществ с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

Концентраты используют для получения других лекарственных форм:

- *концентрат для приготовления раствора* – концентрат, предназначенный для получения раствора;

- *концентрат для приготовления суспензии* – концентрат, предназначенный для получения суспензии;

- *концентрат для приготовления эмульсии* – концентрат, предназначенный для получения эмульсии.

По пути введения и способу применения лекарственные формы, полученные из концентратов, предназначенных для их приготовления, используют для приема внутрь, для наружного применения, для местного применения, для парентерального применения Для описания полученной лекарственной формы (разбавленной, разведенной лекарственной формы) используют термин *«Концентрат для приготовления…»* с указанием

наименования получаемой лекарственной формы и пути ее введения (способа применения), например, «концентрат для приготовления раствора для инфузий», «концентрат для приготовления эмульсии для наружного применения» и др.

Концентраты могут быть как в виде дозированной, так и в виде недозированной лекарственной формы.

Упаковка дозированных концентратов может быть однодозовой, многодозовой, или представлять собой комплект упаковки, если концентрат выпущен совместно с растворителем.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Концентраты получают растворением действующих и вспомогательных веществ в соответствующем растворителе или смеси растворителей.

В качестве основных растворителей при получении концентратов для приготовления водных растворов используют воду очищенную или воду для инъекций. В качестве растворителей при получении концентратов для приготовления неводных растворов используют спирт этиловый, масла жирные, диметилсульфоксид и др.

При последующем получении лекарственных форм из концентратов, предназначенных для их приготовления, концентрат, как правило, разбавляют до требуемой концентрации тем растворителем, который был использован при получении концентрата.

Действующие вещества, используемые при получении концентратов, могут представлять собой гигроскопичные, выветривающиеся или содержащие значительное количество кристаллизационной воды фармацевтические субстанции.

При получении концентратов необходимо избегать концентраций растворенного вещества (веществ) близких к насыщенным, так как в условиях понижения температуры возможна их кристаллизация.

В качестве вспомогательных веществ при получении концентратов используют стабилизаторы, солюбилизаторы, антиоксиданты, пластификаторы и другие вещества, разрешенные для медицинского применения.

Концентрированные растворы экстемпорального изготовления, как правило, изготавливают массо-объемным способом в асептических условиях с использованием свежеполученной воды очищенной, если иное не указано в действующих требованиях к изготовлению лекарственных препаратов аптечными организациями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность.

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

Стерильные концентраты производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность». При получении стерильных концентратов используют методы стерилизации в соответствии с ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Концентраты должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Разбавленные (разведенные) лекарственные формы, полученные с использованием концентратов, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных (разбавленных, разведенных) лекарственных форм.

Концентраты, предназначенные для приготовления лекарственных форм для парентерального применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального

применения».

Концентраты, предназначенные для приготовления лекарственных форм для ингаляций, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Описание. Приводят описание цвета, прозрачности раствора (жидкости), запаха – при наличии.

Прозрачность. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления водных растворов, в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», для остальных концентратов – при соответствующем указании в фармакопейной статье или нормативной документации.

Цветность. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления водных растворов, в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей», для остальных концентратов – при соответствующем указании в фармакопейной статье или нормативной документации.

pH. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления водных растворов, для концентратов для приготовления эмульсии, для остальных концентратов – при соответствующем указании в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Допустимый интервал значений pH концентрата должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления спиртовых растворов, содержащих спирт этиловый в концентрации выше 40 %, для концентратов для приготовления эмульсии, для остальных концентратов – при соответствующем указании в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение

проводят в соответствии с ОФС «Плотность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления спиртовых растворов, содержащих спирт этиловый в концентрации ниже 40 % в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вода. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления неводных растворов по методу К.Фишера (полумикрометод) в соответствии с ОФС «Определение воды» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все концентраты, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для концентратов, предназначенных для приготовления лекарственных форм для парентерального применения и других концентратов, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Извлекаемый объем. Испытание проводят для концентратов для приготовления лекарственных форм для парентерального применения и для концентратов для приготовления лекарственных форм для приема внутрь в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения» или ОФС «Извлекаемый объем».

Объем содержимого упаковки. Испытание проводят для всех концентратов, за исключением концентратов для приготовления лекарственных форм для парентерального применения и для концентратов для приготовления лекарственных форм для приема внутрь в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Информация о способе получения, условиях хранения и сроках годности разведенной (разбавленной) лекарственной формы, приготовленной из концентрата, должна быть указана в маркировке или инструкции по применению лекарственного препарата.

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 не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Леденцы **ОФС.1.4.1.0030.18**

Вводится впервые

Леденцы – твердая дозированная лекарственная форма, получаемая способом выливания, содержащая одно или несколько действующих веществ, равномерно распределенных в соответствующей основе, и предназначенная для рассасывания с целью оказания местного действия в полости рта и глотке.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Леденцы получают методом выливания. В качестве основы для производства леденцов, как правило, используют смесь сахарозы и жидкой глюкозы (смесь глюкозы, олигосахаридов и полисахаридов) в соотношении около 60:40. Приготовление смеси проводят при определенной температуре (от 90 до 140°С). Полученная смесь должна иметь пластичную консистенцию и содержать около 1 % влаги. Затем в основу вводят действующее вещество (вещества) и различные вспомогательные вещества (красители, ароматизаторы, корригенты вкуса, консерванты и др.). После перемешивания полученную карамельную массу охлаждают и путем выливания получают леденцы необходимой формы и размера.

При производстве, упаковке и хранении леденцов, учитывая высокое содержание в них сахаров, должны быть предприняты меры, обеспечивающие необходимую микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Леденцы должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Леденцы, как правило, имеют округлую форму, гладкую и

однородную поверхность. Диаметр леденцов округлой формы составляет, как правило, от 15 до 20 мм.

Приводят описание формы и цвета леденцов, запаха – при наличии. Поверхность леденца должна быть гладкой, однородной, если не обосновано иное. Допускается неравномерность окрашивания, наличие пузырьков воздуха в карамельной массе и незначительная неровность краев.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Однородность дозирования. Леденцы должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят также, как для лекарственной формы «Таблетки». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все леденцы должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом защищенном от света месте при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лиофилизаты	**ОФС.1.4.1.0031.18** **Вводится впервые**

Лиофилизаты – твердая лекарственная форма в виде порошка или пористой массы, полученная путем лиофилизации лекарственных средств жидкой или мягкой консистенции.

Лиофилизаты могут содержать одно или несколько действующих веществ с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

Лиофилизаты используют для получения других лекарственных форм:

- *лиофилизат для приготовления раствора* и *лиофилизат для приготовления спрея* – лиофилизат, предназначенный для получения раствора или спрея путем его растворения в соответствующем растворителе;

- *лиофилизат для приготовления суспензии* и *лиофилизат для приготовления эмульсии* – лиофилизат, предназначенный для получения суспензии или эмульсии путем его диспергирования в соответствующем растворителе;

- *лиофилизат для приготовления капель* и *лиофилизат для приготовления концентрата* – лиофилизат, предназначенный для получения капель или концентрата путем его растворения или диспергирования в соответствующем растворителе.

По пути введения и способу применения лекарственные формы, полученные из лиофилизатов, предназначенных для их приготовления, наиболее часто используют для парентерального применения, но могут быть также использованы для приема внутрь, наружного или местного применения. Для описания полученной лекарственной формы (восстановленной лекарственной формы) используют термин *«Лиофилизат для приготовления…»* с указанием наименования получаемой лекарственной

формы и пути ее введения (способа применения), например, «лиофилизат для приготовления раствора для инфузий», «лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения»; «лиофилизат для приготовления капель глазных» и др.

Лиофилизаты, как правило, являются дозированной лекарственной формой.

Упаковка дозированных лиофилизатов может быть однодозовой, многодозовой, или представлять собой комплект упаковки, если лиофилизат выпущен совместно с растворителем.

Лиофилизаты могут быть использованы в качестве фармацевтических субстанций при производстве лекарственных препаратов в других лекарственных формах.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Метод лиофилизации применяют для производства лекарственных средств, которые нестабильны при повышенных температурах (термолабильны), гидролитически неустойчивы или растворы которых нестабильны при длительном хранении (например, иммунобиологические препараты, препараты крови, антибиотики, ферменты, гормоны и др.). В лиофилизированной форме лекарственное средство полностью сохраняет свою фармакологическую активность.

Лиофилизация (лиофильная сушка) представляет собой процесс удаления растворителя из замороженного материала путем возгонки (сублимации) кристаллов растворителя в условиях вакуума, т.е. превращения его в пар, минуя жидкую фазу.

Процесс лиофилизации состоит из трех основных стадий: замораживания, сублимации кристаллов растворителя (первичной сушки) и удаления остатков растворителя (вторичной сушки).

Стадия замораживания является одной из определяющих стадий для получения качественного лекарственного средства в форме лиофилизата.

Температура замораживания определяется эвтектической зоной для

лиофилизируемого лекарственного средства, то есть такой температурой, при которой достигается максимальная концентрация действующего вещества.

При замораживании растворов, содержащих воду и растворенные в ней вещества, происходит их эвтектическое разделение. Оно заключается в том, что сначала замерзает чистая вода, а вещества концентрируются в незамерзающей части до тех пор, пока раствор не достигнет эвтектической концентрации. Температура, при которой достигается максимальная концентрация данного вещества и происходит замораживание всего раствора, называется эвтектической или криогидратной. Эвтектическую точку определяют как момент образования однородной физической смеси двух или более твердых кристаллических веществ, имеющих одинаковые физические свойства, как это происходит в однокомпонентном продукте.

Скорость замораживания имеет важное значение для качества конечного продукта. Быстрое замораживание применяется в случае лекарственных средств, для которых важно сохранение клеточной структуры (плазмы крови, микроорганизмов и др.). Для быстрого замораживания используют сжиженные газы или охлаждающие смеси. Для большинства других лекарственных средств используется медленное замораживание. Его осуществляют в морозильных камерах или в воздушной среде в камерах сублимационных установок.

Удаление растворителя при лиофильной сушке осуществляется главным образом за счет сублимации. Сублимация представляет собой процесс удаления растворителя из замороженного объекта без образования жидкой фазы, она проводится под вакуумом или значительно реже – в инертном газе.

К вспомогательным веществам, используемым в производстве лиофилизатов относят: растворители, солюбилизаторы (ЭДТА, α-циклодекстрин и др.) , наполнители (маннит, глицин, глюкоза, сахароза, лактоза, молоко и др.), консерванты (бензиловый спирт, этил- и метилпарагидроксибензоат и др.), регуляторы pH (буферные растворы,

натрия гидроксид, хлористоводородная кислота), стабилизаторы, криопротекторы (декстран, желатин, гидроксиэтилкрахмал и др.). Они должны обеспечить сохранение надлежащего терапевтического эффекта и фармакокинетических параметров лекарственного средства.

Наиболее часто лиофилизацию проводят из водного раствора. Также при получении лиофилизатов могут быть использованы неводные растворители (этанол, трет-бутанол и др.). Применение неводных растворителей позволяет увеличить скорость сублимации (первичной сушки), уменьшить время растворения или диспергирования лиофилизата при получении конечной лекарственной формы и улучшить ее стабильность.

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

Стерильные лиофилизаты производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Лиофилизаты должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Восстановленные лекарственные формы, полученные с использованием лиофилизатов, предназначенных для их приготовления, должны соответствовать требованиям ОФС, регламентирующих качество полученных лекарственных форм. В фармакопейной статье или нормативной документации указывают **«Время растворения/Время диспергирования»,** приводят методику, условия проведения испытания и, при необходимости, **«Описание»** восстановленной лекарственной формы.

Лиофилизаты, предназначенные для приготовления лекарственных

форм для парентерального применения, должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Лиофилизаты, предназначенные для приготовления капель глазных, должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

Лиофилизаты, предназначенные для приготовления лекарственных форм для ингаляций должны выдерживать требования ОФС «Лекарственные формы для ингаляций».

Описание. Лиофилизаты могут быть в виде порошка, аморфной пористой массы, пористой массы, уплотненной в таблетку, или иметь иную форму.

Приводят описание лиофилизата (сухая пористая масса, в виде таблетки, цельная или раскрошенная масса и др.), указывают цвет, запах – при наличии.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Вода или Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации в тех случаях, когда содержание воды может влиять на физико-химические свойства лиофилизата, биодоступность действующего вещества (веществ), на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «Лиофилизат» и т.д. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды» или ОФС «Потеря в массе при высушивании». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Показатели «Потеря в массе при высушивании» и «Вода» могут быть альтернативными, кроме случая, когда определение потери в массе при

высушивании необходимо для контроля содержания остаточных органических растворителей.

Однородность дозирования. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Микробиологическая чистота. Все лиофилизаты, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для лиофилизатов, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пастилки **ОФС.1.4.1.0032.18**

Вводится впервые

Пастилки – твердая дозированная лекарственная форма, представляющая собой упруго-пластичную основу с равномерно распределенным в ней действующим веществом (веществами), предназначенная для рассасывания с целью оказания местного действия в полости рта и глотке.

Пастилки могут быть покрыты оболочкой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Пастилки производят путем формовки (отливки) пластичной массы, содержащей, ароматизированную и подслащенную, как правило, основу с введенным в нее действующим веществом (веществами).

В качестве основы пастилок используют природные высокомолекулярные соединения или синтетические полимеры или смолы с добавлением корригентов вкуса и запаха, пищевых красителей и других вспомогательных веществ, обеспечивающих особенность способа применения пастилок – постепенно растворяться при рассасывании в полости рта.

Приятный вкус пастилок, как правило, обеспечивается за счет использования в их составе сахарозы и ее производных, а также маннита (маннитола), ксилита (ксилитола), аспартама, сахарина, сукралозы и других веществ этого класса.

В качестве вспомогательных веществ при производстве пастилок используют также консерванты (сорбиновая кислота), пластификаторы и др.

ИСПЫТАНИЯ

Пастилки должны соответствовать общим требованиям

ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета пастилок, указывают запах – при наличии. Поверхность пастилки должна быть гладкой, однородной, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иначе, в качестве жидкой среды используют воду. Время распадаемости должно составлять не более 30 мин, если иное не обосновано и не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации в тех случаях, когда содержание воды может влиять на физико-химические свойства основы (сохранение упруго-пластичных свойств), свойства действующего вещества (веществ), стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «Пастилки» и т.д. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации

Однородность дозирования. Пастилки должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят также, как для лекарственной формы «Таблетки». Нормативные требования

приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все пастилки должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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 не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пены	**ОФС.1.4.1.0033.18** **Вводится впервые**

Пены – лекарственная форма, представляющая собой раствор, эмульсию или суспензию действующих и вспомогательных веществ (в том числе поверхностно-активных), которые находятся под давлением пропеллента в герметичной упаковке, снабженной клапанно-распылительной системой, обеспечивающей высвобождение содержимого в виде дисперсии газа в жидких, реже твердых фазах.

Пены представляют собой трехфазную дисперсную систему, содержащую действующие вещества с добавлением поверхностно-активных вспомогательных веществ, растворителей и других веществ, находящихся под давлением газа-пропеллента.

В зависимости от природы дисперсионной среды различают водные и неводные пены (водно-спиртовые, масляные и др.).

В зависимости от свойств действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав лекарственного препарата, пены могут быть быстроразрушающимися и стабилизированными.

В зависимости от пути введения и способа применения выделяют пены для наружного применения и пены для местного применения.

Пена для наружного применения – пена, предназначенная для наружного применения. Пены для наружного применения после оседания могут образовывать защитную пленку.

Пена вагинальная – пена, предназначенная для введения во влагалище.

Пена внутриматочная – пена, предназначенная для введения в полость матки.

Пена ректальная – пена, предназначенная для введения в прямую кишку с целью оказания местного действия.

Пены могут быть дозированными и недозированными.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Вспомогательные вещества, входящие в состав пен, должны обеспечивать оптимальные технологические характеристики лекарственной формы, быть совместимы с другими компонентами лекарственной формы и материалом упаковки.

Пены могут быть получены с использованием водных и неводных растворителей. В качестве водных растворителей используют воду очищенную или воду для инъекций; неводных растворителей – спирты, минеральные и жирные масла и др.

В состав пен обязательно вводят раствор поверхностно-активного вещества (веществ) и газ-пропеллент, а также стабилизаторы, консерванты и другие вспомогательные вещества, разрешенные для медицинского применения.

Поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты) используют для обеспечения распределения газа в дисперсионной среде и стабилизации пены.

Стабильная пена образуется, если пропеллент (например, пропан, бутан, изобутан, их смеси и др.), как правило, вводят в состав дисперсной фазы (эмульсия типа «масло в воде»).

Упаковка пен, как правило, представляет собой аэрозольные баллоны из различных материалов (алюминия, стекла и др.), снабженные клапанным устройством с распылителем.

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

Стерильные пены производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в соответствии с ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в

соответствии с ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Пены должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание консистенции, цвета пены, запаха – при наличии. В описании консистенции пен могут быть применимы следующие термины: кремообразная, мелкоячеистая, пузырящаяся и др.

pH. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определяют значение pH полученного водного раствора после оседания пены или после растворения лекарственного препарата в воде потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Значение pH указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Давление в упаковке. Герметичность упаковки. Пены должны выдерживать испытания по указанным показателям в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи».

Испытание клапанного устройства. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Методика определения должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации.

Выход содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных пен в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи».

Однородность массы дозы или **Однородность дозирования. Количество доз в упаковке**. Испытания проводят для дозированных пен в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи».

Относительная плотность пены. Аэрозольный баллон выдерживают при температуре 25 °C в течение не менее 24 ч. Следят за тем, чтобы

аэрозольный баллон не нагревался: устанавливают на насадку аэрозольного баллона жесткую трубку длиной 70-100 мм с внутренним диаметром отверстия около 1 мм. Аэрозольный баллон встряхивают для получения содержимого в виде однородной фазы, выпускают и отбрасывают 5-10 мл пены. Взвешивают плоскодонную чашу вместимостью около 60 мл и высотой около 35 мм. Помещают конец жесткой трубки, прикрепленной к насадке аэрозольного баллона, в угол чаши и нажимают насадку. Круговыми движениями равномерно заполняют чашу. После того, как пена полностью расширится, сглаживают ее уровень, удалив излишки пены предметным стеклом. Взвешивают. Определяют массу такого же объема воды очищенной, наполнив ту же чашу.

Относительную плотность пены (ρ) рассчитывают по формуле:

$$\rho = \frac{m}{e},$$

где m – масса испытуемого образца пены, г;

e – масса такого же объема воды очищенной, г.

Проводят три определения. Ни одно полученное значение не должно отклоняться от среднего значения более чем на 20 %.

Время пенообразования. Прибор для определения времени пенообразования представлен на рисунке 1. Прибор состоит из бюретки (*1*) вместимостью 50 мл, с внутренним диаметром 15 мм и ценой деления 0,1 мл, снабженной запорным краном (*2*) с одним отверстием диаметром 4 мм. Отметка, соответствующая 30 мл, должна находиться на расстоянии не менее 210 мм от оси запорного крана. Нижняя часть бюретки соединена при помощи пластиковой трубки (*3*) длиной не более 50 мм и с внутренним диаметром 4 мм с аэрозольным баллоном (*4*), оборудованным подходящей для данного соединения насадкой нажимного типа. Аэрозольный баллон выдерживают при температуре 25 °С в течение не менее 24 ч. Следят за тем, чтобы аэрозольный баллон не нагревался, встряхивают для получения содержимого в виде однородной фазы, выпускают и отбрасывают 5-10 мл

пены. Соединяют насадку аэрозольного баллона (*5*) и носик бюретки. Открывают запорный кран, нажимают на насадку и выпускают одну дозу пены объемом около 30 мл, закрывают запорный кран и одновременно включают секундомер. Наблюдают за объемом пены в бюретке, каждые 10 с отмечают увеличение пены до тех пор, пока не будет достигнут максимальный объем. Проводят три определения.

Время достижения максимального объема в каждом определении не должно превышать 5 мин.

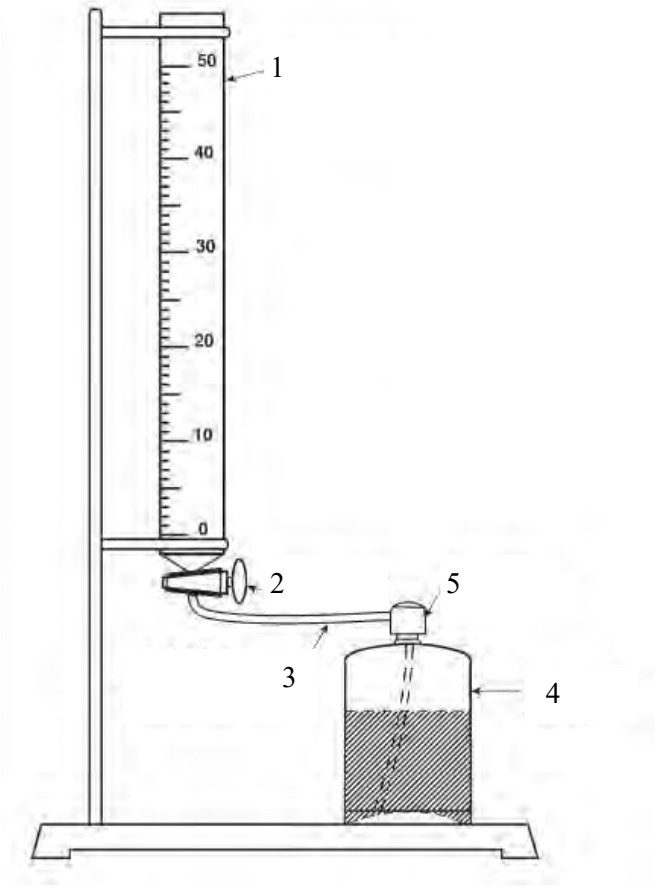


Рисунок 1 – Прибор для определения времени пенообразования

1 – бюретка; 2 – запорный кран; 3 – пластиковая трубка;
4 – аэрозольный баллон под давлением; 5 – насадка аэрозольного баллона

Размер частиц. Испытание проводят для пен суспензионного и комбинированного типа. Методика определения и требования к размеру частиц дисперсной фазы должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все пены, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные пены должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС Стерильность».

Масса содержимого упаковки. Испытание проводят для недозированных пен в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

Упаковка пен и все ее элементы, включая распылительные, дозирующие устройства, насадки, предохранительные колпачки и т.п., должны соответствовать требованиям ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке пен должны быть предусмотрены предупредительные надписи: «Хранить вдали от источника огня, отопительной системы и прямых солнечных лучей», «Не вскрывать», «Предохранять от падений и ударов» и ,при необходимости, другие надписи.

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, вдали от отопительной системы и прямых солнечных лучей, при температуре не выше 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пилюли **ОФС.1.4.1.0034.18**

Взамен ГФ X, ст.535

Пилюли – твердая дозированная лекарственная форма для приема внутрь в виде шариков, как правило, массой от 0,1 до 0,5 г, диаметром не более 8 мм, полученных из однородной пластичной массы. Пилюли массой более 0,5 г называются болюсами.

Пилюли могут быть покрыты оболочкой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Основные стадии процесса получения пилюль: подготовка и смешивание действующих и вспомогательных веществ, получение пилюльной массы, формирование пилюль.

Пилюльная масса представляет собой однородную пластичную массу, состоящую из смеси действующих и вспомогательных веществ. Образование упруго-пластичной пилюльной массы, необходимой для придания пилюлям надлежащей сферической формы, массы и объема, должны обеспечивать вспомогательные вещества.

При производстве пилюль используют вспомогательные вещества – растворители, уплотнители, пластификаторы, связующие вещества, такие как вода очищенная, глицерин, сахар, крахмал, сироп сахарный, растительные порошки (солодки корней и др.), мед, экстракты густые (солодки корней, валерианы, полыни, одуванчика и др.) и др.

Для введения в пилюльную массу действующие и вспомогательные вещества вначале тщательно перемешивают. Если в состав пилюль входят действующие вещества, растворимые в том или ином растворителе, разрешенном для приема внутрь, то их предварительно растворяют в этом растворителе. Нерастворимые действующие вещества тщательно растирают в мельчайший порошок с соответствующим вспомогательным веществом.

Из действующих веществ, обладающих окислительными свойствами (серебра нитрат, калия перманганат) получают пилюльную массу с добавлением вспомогательных веществ неорганической природы (каолин, бентонит и др.).

Пилюли аптечного изготовления, как правило, обсыпают порошком ликоподия, крахмалом или другим вспомогательным веществом, предназначенным для этих целей. Пилюли аптечного изготовления с окислителями обсыпают белой глиной.

Пилюли промышленного производства могут быть покрыты оболочками из сахара или кишечнорастворимой оболочкой.

ИСПЫТАНИЯ

Пилюли должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Пилюли должны иметь правильную шарообразную форму, не изменяющуюся при хранении. Поверхность пилюль должна быть сухой и гладкой, в разрезе они должны быть однородны.

Приводят описание внешнего вид пилюль с указанием формы, цвета, запаха – при наличии, характера поверхности. Однородность определяют визуально по отсутствию вкраплений, включений на срезе пилюли.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Распадаемость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, пилюли должны распадаться в течение 1 ч.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в

соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Около 0,5 г (точная навеска) порошка измельченных пилюль высушивают при температуре 105 °С до постоянной массы. Потеря в массе должна быть не более 10 %.

Пилюли, в состав которых входят густые и сухие экстракты, должны выдерживать испытания по показателям качества «Зола общая» и «Тяжелые металлы».

Зола общая. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тяжелые металлы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Пилюли должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят также, как для лекарственной формы «Таблетки». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Пилюли должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом и, при необходимости,

защищенном от света месте, при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пленки	**ОФС.1.4.1.0035.18**
	Вводится впервые

Пленки – твердая дозированная лекарственная форма, представляющая собой одно или многослойные тонкие пластинки подходящего для применения размера, содержащие одно или несколько действующих веществ и вспомогательные, в том числе пленкообразующие, вещества.

В зависимости от пути введения и способа применения различают пленки глазные и пленки для применения в полости рта.

Пленки глазные – стерильные пленки, предназначенные для помещения в конъюнктивальный мешок глаза.

Пленки глазные должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

К пленкам для применения в полости рта относят пленки для наклеивания на десну, защечные, диспергируемые в полости рта, периодонтальные, подъязычные.

Пленки для наклеивания на десну – пленки, предназначенные для наклеивания на десну с целью оказания местного действия.

Пленки защечные – пленки, предназначенные для помещения в щечный карман с целью оказания системного действия.

Пленки, диспергируемые в полости рта – пленки, предназначенные для помещения в полость рта, где они быстро диспергируются перед проглатыванием.

Пленки периодонтальные – пленки, предназначенные для помещения в карман между зубом и десной.

Пленки подъязычные – пленки, предназначенные для помещения под язык с целью оказания системного действия.

По типу высвобождения пленки относят к лекарственным формам с

модифицированным, как правило пролонгированным, высвобождением.

Пленки могут быть произведены на основе биодеградируемых/растворимых материалов *(биодеградируемые пленки)* и на основе небиодеградируемых материалов *(небиодеградируемые пленки).*

Биодеградируемые пленки не требуют удаления из места применения при завершении лечения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Тонкие пластинки пленок получают, как правило, методом выливания или экструзии.

В качестве пленкообразующей основы (матрицы) при производстве пленок из биодеградируемых материалов используют полимерные материалы синтетического и природного происхождения, не взаимодействующие химически и биологически с действующим веществом (веществами) и обладающие склонностью к набуханию и постепенному высвобождению действующего вещества (веществ). Пленки могут быть получены на основе пищевых полимеров, таких как пуллулан, или водорастворимых полимеров, таких как модифицированная целлюлоза, пищевые камеди, а также сополимеров, получаемых, например, путем совместной полимеризации акриламида, N-винилпирролидона и этилакрилата в водном растворе (полимер биорастворимый для лекарственных пленок) и др.

Вспомогательные вещества, используемые при получении пленок, должны обеспечить контролируемое высвобождение действующего вещества (веществ) из полимерной основы в заданном интервале времени и другие необходимые технологические характеристики лекарственной формы.

В качестве вспомогательных веществ при производстве пленок используют также пластификаторы (глицерин), консерванты, стабилизаторы, адгезивные (клеящие) вещества (поливинилпирролидон, поливиниловый спирт) и др. При производстве пленок, предназначенных для применения в полости рта, в качестве вспомогательных веществ используют также

корригенты вкуса, ароматизаторы.

Действующее вещество (вещества) в основу пленки может быть введено в виде раствора, эмульсии или суспензии.

Отдельные слои многослойных пленок могут содержать различные концентрации и модификации действующего вещества (веществ).

При получении многослойных пленок из растворов на подложку (форму) наносят несколько слоев с последовательным высушиванием каждого слоя.

Технология производства пленок должна обеспечивать сохранение их целостности в процессе производства, упаковки, хранения и применения.

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

Стерильные пленки производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов и обеспечивающих их стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность». Для получения стерильных пленок могут быть использованы радиационные методы стерилизации в соответствии с ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Пленки должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета пленки, запаха – при наличии.

Размеры пленки. Определяют геометрические размеры (длину, ширину, толщину) пленки в мм путем измерения микрометром. Количество пленок для испытания и допустимые отклонения размеров пленки приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных

форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Распадаемость. Испытание проводят для пленок из биодеградируемых материалов в соответствии с методикой определения и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Пленки должны распадаться в течение времени, указанного в фармакопейной статьи или нормативной документации.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» согласно указаниям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Если в фармакопейной статье или нормативной документации предусмотрено испытание по показателю «Растворение», то допускается не проводить испытание по показателю «Распадаемость».

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации в тех случаях, когда содержание воды может влиять на биодоступность действующего вещества (веществ), на стабильность лекарственного препарата в лекарственной форме «пленки» и т.д. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Нормативные требования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

pH раствора. Испытание проводят для пленок из биодеградируемых материалов потенциометрически в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Методику подготовки пробы для испытания и нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность дозирования. Пленки должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят

также, как для лекарственной формы «Таблетки». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все пленки, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для пленок, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плитки **ОФС.1.4.1.0036.18**

Вводится впервые

Плитки – твердая лекарственная форма, представляющая собой пластичную массу с равномерно распределенным в ней действующим веществом (веществами), имеющая форму плитки определенного размера и предназначенная для приема внутрь целиком или частями.

Плитка может быть целой или поделенной на равные части (доли) с помощью нанесенных на ее поверхность рисок.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Лекарственные препараты в лекарственной форме «плитки» производят методом формования из пластичной массы, представляющей собой основу, в которую предварительно вводят действующие и вспомогательные вещества.

Для производства пластичной основы плиток используют сахарный сироп, крахмальную патоку, молоко сгущенное с сахаром, альбумин пищевой и другие, подходящие для этих целей вспомогательные вещества. Как правило, сначала получают молочно-сахарный сироп, а затем в него вводят действующие и вспомогательные вещества и из полученной массы формируют плитки.

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

ИСПЫТАНИЯ

Плитки должны соответствовать общим требованиям

ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета, плиток, указывают запах – при наличии. При необходимости, приводят описание плитки на поперечном разрезе или изломе. Если плитка поделена на доли, указывают их количество.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, потеря в массе при высушивании должна составлять не более 8,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы плитки. Испытание проводят на 10 плитках. Каждую плитку взвешивают с точностью до 0,1 г. Вычисляют среднюю массу и отклонения от средней массы плитки. Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все плитки должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Как правило, плитки упаковывают в комбинированный материал на бумажной основе или двухслойный пленочный материал.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

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 15 до 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Резинки жевательные лекарственные **ОФС.1.4.1.0037.18**

Вводится впервые

Резинки жевательные лекарственные – твердая дозированная лекарственная форма «резиноподобной» консистенции, предназначенная для жевания в течение определенного периода времени без последующего проглатывания с целью оказания местного действия в полости рта и глотке или системного действия.

Резинки жевательные лекарственные могут содержать одно или несколько действующих веществ.

Резинки жевательные лекарственные могут быть покрыты оболочкой.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Резинки жевательные лекарственные получают методом прессования порошка основы или плавления жевательной основы с последующим внесением в нее действующих и вспомогательных веществ и приданием полученной смеси необходимой формы. В установленных случаях резинки жевательные лекарственные покрывают оболочкой.

Жевательная основа состоит преимущественно из синтетических полимеров с добавлением воска, смол и карбоната кальция. В качестве вспомогательных веществ в жевательную основу добавляют пластификаторы, вкусовые добавки, подсластители, ароматизаторы, консерванты, красители и др.

При производстве, упаковке и хранении резинок жевательных лекарственных должны быть предприняты меры, обеспечивающие необходимую микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Резинки жевательные лекарственные должны соответствовать общим

требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы и цвета резинок жевательных лекарственных, указывают размеры резинки жевательной лекарственной в мм, запах – при наличии. В случае покрытия резинок жевательных лекарственных оболочкой, указывают ее наличие и характер.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, содержание воды или потеря в массе при высушивании резинок жевательных лекарственных должно составлять не более 7,0 %.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для жевательных лекарственных резинок» согласно указаниям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Однородность дозирования. Резинки жевательные лекарственные должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят также, как для лекарственной формы «Таблетки». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все резинки жевательные лекарственные должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, при температуре не выше 25°С в сухом месте, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Системы терапевтические	**ОФС.1.4.1.0038.18** **Вводится впервые**

Системы терапевтические – лекарственная форма, представляющая собой систему доставки и специфического высвобождения действующего вещества (веществ) в течение определенного, как правило, продолжительного периода времени. Высвобождение действующего вещества (веществ) из системы терапевтической осуществляется запрограммированным образом.

Термин «система терапевтическая» для обозначения лекарственной формы допускается использовать только в том случае, если для обозначения лекарственной формы с действием, аналогичным системам терапевтическим, не применимы другие, более подходящие термины, например, пленки, имплантаты, трансдермальные пластыри и др.

Для правильного использования лекарственной формы в названии системы терапевтической обязательно должен быть указан способ введения.

Система вагинальная терапевтическая – система, предназначенная для введения и высвобождения действующего вещества во влагалище.

Система внутриматочная терапевтическая – система, предназначенная для введения и высвобождения действующего вещества в полости матки.

Различают системы терапевтические, оказывающие общее (системное) действие на организм человека, и системы терапевтические с направленной доставкой действующего вещества к заданному органу (ткани) – мишени.

Система терапевтическая может иметь устройство доставки. Если в маркировке системы терапевтической не указано иное, то устройство доставки должно быть удалено после использования.

Обозначение дозировки действующих веществ в системе

терапевтической может быть указано как количество действующего вещества, высвобождаемого из лекарственной формы за определенный период времени, например, 20 мкг/24 часа, или как концентрация в названии лекарственного препарата, например, в процентах.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Основными компонентами систем терапевтических являются резервуар для лекарственного препарата и мембрана (мембраны), обеспечивающая, в том числе, запрограммированную (контролируемую) скорость высвобождения действующего вещества в течение определенного времени. Устройства доставки лекарственной формы к месту применения могут иметь различную форму, определяющую внешний вид системы.

При производстве систем терапевтических в качестве вспомогательных веществ используют биосовместимые полимерные материалы, в которые вводят действующее вещество (вещества). Введение в лекарственную форму действующего вещества на полимерном носителе при применении лекарственного препарата должно обеспечить пролонгирование его действия, контролируемое высвобождение действующего вещества из полимерной основы в заданном интервале времени и другие необходимые биофармацевтические параметры. Действующие и вспомогательные вещества, устройство доставки, материал упаковки должны быть совместимы между собой и с другими компонентами лекарственного препарата. В качестве полимерного материала-носителя используется, например, полидиметилсилоксановый эластомер и др.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании систем терапевтических должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильные системы терапевтические производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих их стерильность и исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в

соответствии с ОФС «Стерилизация».

ИСПЫТАНИЯ

Системы терапевтические должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание внешнего вида системы терапевтической, включая описание устройства доставки.

Растворение. Испытание проводят в соответствии с методикой и нормативными требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Определяют количество действующего вещества, которое должно высвободится из системы терапевтической в среду растворения за определенный промежуток времени.

Прочность. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с методикой и нормативными требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Все системы терапевтические, за исключением стерильных должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Стерильные системы терапевтические должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В установленных случаях упаковка должна обеспечивать стерильность.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность и, при необходимости, стерильность, в течение указанного срока годности лекарственного препарата, в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Соки	**ОФС.1.4.1.0039.18** **Вводится впервые**

Соки – жидкая лекарственная форма, представляющая собой выжатый сок, полученный из свежего лекарственного растительного сырья с добавлением действующих и (или) вспомогательных веществ.

Соки подразделяют на простые, полученные из одного вида лекарственного растительного сырья, и сложные (комплексные) – из смеси двух и более видов лекарственного растительного сырья.

Соки могут представлять собой лекарственные формы лекарственных растительных препаратов, *предназначенных для приема внутрь, для наружного применения* или *для местного применения*. Кроме того, соки могут быть использованы в качестве фармацевтических субстанций в составе других лекарственных препаратов, представляющих собой, например, жидкие лекарственные формы, включая капли для приема внутрь, а также мази, таблетки и др.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Для получения соков используют свежее лекарственное растительное сырье, как правило, с высоким содержанием воды. Качество используемого свежего лекарственного растительного сырья должно отвечать требованиям соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации.

Соки получают методом прессования предварительно измельченного свежего лекарственного растительного сырья. Для повышения выхода сока применяют повторное измельчение и прессование сырья, предварительную мацерацию измельченного лекарственного растительного сырья соответствующими экстрагентами перед прессованием, а также другие

подходящие методы.

Полученную жидкость – выжатый сок, подвергают очистке путем добавления этилового спирта, нагревания при определенной температуре или другими методами, обеспечивающими удаление балластных веществ.

После обработки сок подвергают очистке, выдерживая при определенной температуре в течение установленного времени для осаждения оставшихся балластных веществ, которые затем отделяют фильтрованием или центрифугированием.

В состав соков вводят вспомогательные и, в ряде случаев, действующие вещества. Полученный сок стандартизируют.

В качестве вспомогательных веществ используют антимикробные консерванты, стабилизаторы, антиоксиданты и другие вещества, разрешенные к медицинскому применению.

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

Стерильные соки производят с использованием материалов и методов, исключающих возможность микробного загрязнения и роста микроорганизмов в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация» и обеспечивающих их стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

ИСПЫТАНИЯ

Соки должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Соки, как правило, представляют собой прозрачную жидкость. Допускается наличие опалесценции, взвеси, в ряде случаев, особенно в процессе хранения, возможно образование незначительного осадка, если это не влияет на эффективность и безопасность лекарственного средства.

Приводят описание внешнего вида сока с указанием, прозрачности или опалесценции, цвета, запаха – при наличии.

Плотность. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Спирт этиловый. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сухой остаток. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». 5,0 мл сока помещают во взвешенный бюкс, выпаривают на водяной бане досуха и сушат в сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре (102,5±2,5) °С, затем 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 требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тяжелые металлы. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Тяжелые металлы». 10 мл сока 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 в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывают фильтр 5 мл воды

и доводят объем фильтрата водой до метки, перемешивают. 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытания на тяжелые металлы (ОФС «Тяжелые металлы», метод 1). Содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,01 %.

Микробиологическая чистота. Все соки, за исключением стерильных, должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Испытание проводят для соков, к которым предъявляется требование стерильности в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Объем (масса) содержимого упаковки. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» в упаковке, обеспечивающей защиту от света, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для соков, в которых возможно образование опалесценции или незначительного осадка (при хранении), должна быть предусмотрена предупредительная надпись «Перед употреблением взбалтывать».

Для стерильных лекарственных форм приводят указание о стерильности лекарственного препарата.

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.

Тампоны лекарственные **ОФС.1.4.1.0040.18**

Вводится впервые

Тампоны лекарственные – дозированная лекарственная форма, предназначенная, как правило, для введения в естественные отверстия тела на ограниченный период времени, состоящая из мягкого волокнистого материала, пропитанного действующим веществом (веществами) с добавлением или без добавления вспомогательных веществ.

В зависимости от пути введения и способа применения различают следующие виды тампонов лекарственных:

- *тампоны лекарственные вагинальные* – тампоны лекарственные, предназначенные для введения во влагалище;

- *тампоны лекарственные ректальные* – тампоны лекарственные, предназначенные для введения в прямую кишку;

- *тампоны лекарственные ушные* – тампоны лекарственные, предназначенные для введения в наружный слуховой проход;

- *тампоны лекарственные для ингаляций* – тампоны лекарственные, как правило, помещаемые в соответствующие аппликаторы цилиндрической формы с закругленным концом и отверстием, предназначенные для ингаляций через носовые ходы.

Тампоны лекарственные вагинальные и тампоны лекарственные ушные предназначены для оказания местного действия, тампоны лекарственные ректальные и тампоны лекарственные для ингаляций – для оказания системного действия.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Тампоны лекарственные производят из тканных и нетканных

природных и синтетических гипоаллергенных материалов (например, производных целлюлозы, коллагена, силикона и др.), которым придают необходимую форму и размер и пропитывают композицией действующих и вспомогательных веществ.

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

ИСПЫТАНИЯ

Тампоны лекарственные, помещенные в аппликатор, должны быть извлечены из аппликатора перед проведением испытаний.

Тампоны лекарственные должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание формы, цвета, геометрические размеры в мм тампонов лекарственных, указывают запах – при наличии.

pH водного извлечения. Испытание проводят потенциометрически в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Значение pH должно находиться в диапазоне значений, приемлемых для обозначенного пути введения и способа применения лекарственного препарата в лекарственной форме «Тампоны лекарственные». Методику пробоподготовки образца лекарственного препарата для проведения испытания и нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Испытание не проводят для тампонов лекарственных для ингаляций.

Однородность массы. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно указаниям в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание не применяют в случае, если предусмотрено испытание на однородность дозирования для всех действующих веществ.

Однородность дозирования. Тампоны лекарственные должны выдерживать требования ОФС «Однородность дозирования». Нормативные требования приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Микробиологическая чистота. Тампоны лекарственные должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Как правило, каждый тампон лекарственный упаковывают в индивидуальную первичную упаковку из полимерных материалов.

Упаковка тампонов лекарственных может быть однодозовой и многодозовой.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Шампуни лекарственные	**ОФС.1.4.1.0041.18**
	Вводится впервые

Шампуни лекарственные – жидкая или мягкая, легко вспениваемая лекарственная форма, содержащая действующие и вспомогательные вещества, в том числе поверхностно-активные вещества, предназначенная для наружного применения путем нанесения на волосы и кожу головы и последующего смывания водой.

Шампуни лекарственные по типу дисперсной системы могут быть гомогенными (растворы), гетерогенными (суспензии, эмульсии), а также являться комбинированными дисперсными системами.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Как правило, шампуни лекарственные получают растворением действующих веществ в воде очищенной с добавлением поверхностно-активных веществ и других вспомогательных веществ: загустителей, стабилизаторов, консервантов, регуляторов pH, ароматизаторов, красителей, кондиционирующих веществ и др.

Если действующее вещество не растворяется в воде очищенной, то его вводят в состав лекарственного препарата в виде суспензии или эмульсии.

Помимо воды очищенной, как сорастворитель и/или солюбилизатор, может быть использован спирт этиловый.

В качестве поверхностно-активных веществ наиболее часто применяют натрия лаурилсульфат, натрия лауретсульфат и их смеси с моноэтаноламидом и диэтаноламидом, а также пропилбетаинамидом жирных кислот кокосового масла и др. В качестве загустителей чаще всего используют производные полиэтиленгликоля (макрогола), пропиленгликоль

и др.

В процессе производства шампуней лекарственных суспензионного и комбинированного типа, должен быть обеспечен необходимый размер частиц дисперсной фазы.

При производстве, упаковке, хранении и транспортировании шампуней лекарственных должны быть приняты меры, обеспечивающие их микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ИСПЫТАНИЯ

Шампуни лекарственные должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Приводят описание шампуня лекарственного, его консистенцию, цвет, запах – при наличии.

pH. Испытание проводят потенциометрически в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, значение pH должно находиться в диапазоне от 5,0 до 8,0.

Вязкость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Вязкость» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Испытание не является обязательным, если предусмотрено проведение испытания шампуня лекарственного по показателю «Вязкость».

Пенообразующая способность. Испытание допускается проводить в рамках контроля технологического процесса промышленного производства шампуней лекарственных.

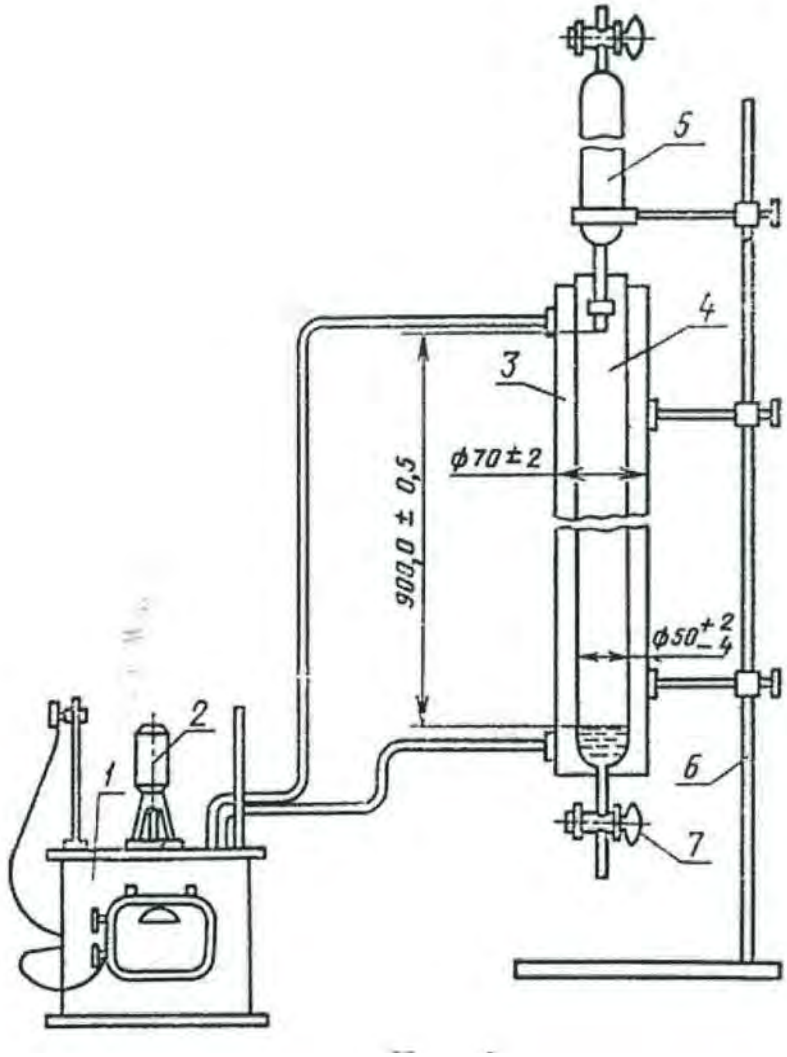


Рис. 1 – Прибор Росс-Майлса
1- термостат, 2- насос,
3-водяная рубашка, 4-мерный цилиндр,
5- стеклянная пипетка, 6-штатив
Размеры указаны в мм

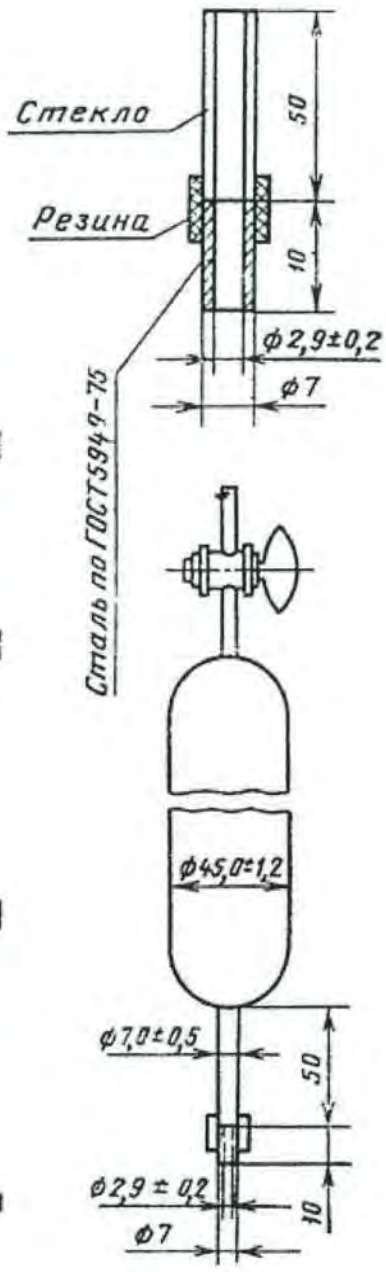


Рис.2 – Стеклянная пипетка
Размеры указаны в мм

Определение проводят на приборе Росс-Майлса (рис.1) или аналогичном приборе. Прибор Росс-Майлса закреплен на штативе (6), состоит из мерного цилиндра с ценой деления 2 мм (4), помещенного в водяную рубашку (3), снабженную двумя выводами для соединения с термостатом (1) и пипетки, соединенной с калиброванной трубкой (5).

Цилиндр сверху закрыт пробкой, которая имеет два отверстия: одно для ввода наконечника стеклянной пипетки (5), второе – для отвода воздуха. Стеклянная пипетка (рис.2) соединена с калиброванной трубкой из стекла или нержавеющей стали.

Измерение проводят при температуре (37±2)°С водного раствора шампуня лекарственного с массовой долей шампуня 0,5 %.

Для проведения испытания отбирают 9 образцов лекарственного препарата, содержимое которых соединяют вместе, тщательно перемешивают и сокращают до средней пробы массой 1 кг.

Приготовление испытуемого раствора. Навеску шампуня, соответствующую 5 г действующего вещества, взятую с погрешностью ± 0,01 г, отбирают от средней пробы, помещают в стакан и растворяют в 50-60 мл воды с заданной жесткостью и перемешивают до полного растворения (для шампуней суспензионного и комбинированного типа − до полного ресуспендирования). Полученный раствор помещают в мерную колбу или цилиндр, доводят объем раствора до 1000 мл водой с заданной жесткостью и перемешивают, избегая пенообразования.

Примечание. Приготовление раствора проводят при температуре испытания с допустимым отклонением ±5°С. Раствор готовят не позднее, чем за 30 мин и не ранее чем за 2 ч до испытания.

Приготовление воды с заданной жесткостью. 8,5 мл раствора А и 1,5 мл раствора Б разбавляют каждый в отдельности водой очищенной, полученной методом дистилляции, до объема 450 мл, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят водой очищенной, полученной методом дистилляции, до метки и перемешивают.

Примечание. *1. Приготовление раствора А.* 40 г кальция хлорида ($CaCl_2 \cdot 4\ H_2O$) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят водой очищенной, полученной методом дистилляции, до метки.

2. Приготовление раствора Б. 44 г магния сульфата ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят водой очищенной, полученной методом дистилляции, до метки.

Для взятия навесок безводных солей необходимо проводить соответствующий пересчет.

Проведение испытания. Подготавливают для испытания прибор Росс-Майлса или аналогичный, доводя до температуры (37±2)°С жидкость в рубашке с помощью термостата. Одновременно 300 мл испытуемого раствора доводят до температуры (37±2)°С. Из этого количества отбирают 50мл раствора, наливают в мерный цилиндр с внутренним диаметром 50 мм по стенке так, чтобы не образовалась пена. Через 10 мин с помощью резиновой груши вводят в пипетку 200 мл испытуемого раствора таким образом, чтобы не образовалась пена. Пипетку с раствором закрепляют в штативе так, чтобы ее выходное отверстие находилось на расстоянии 900 мм от уровня жидкости в цилиндре и обеспечивало попадание струи в центр жидкости. Затем открывают кран пипетки. По истечении раствора из пипетки включают секундомер и через 30 с измеряют высоту образовавшегося столба пены в мм ($H_{0\ изм}$). Затем, через 5 мин измеряют высоту образовавшегося столба пены в мм ($H_{5\ изм}$).

Если уровень столба пены имеет неровную поверхность, то за высоту столба пены принимают среднее арифметическое замеров максимальной и минимальной высоты пены.

Перед каждым новым определением мерный цилиндр промывают водой очищенной, полученной методом дистилляции.

Примечание. Разница между внутренним диаметром мерного цилиндра отдельных приборов оказывает влияние на высоту образовавшегося столба пены, поэтому для каждого прибора необходимо установить поправочный коэффициент, при помощи которого пересчитывают все полученные при измерениях значения на значения, отвечающие высоте столба пены, точно измеренной прибором с внутренним диаметром цилиндра 50 мм.

Поправочный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = \frac{D^2}{2500},$$

где: D – фактический внутренний диаметр цилиндра испытуемого прибора, мм;

$2500 = 50^2$ – внутренний диаметр цилиндра стандартного прибора в квадрате.

Пенообразующую способность (H_0 и H_5) в мм вычисляют по

формулам:

$$H_0 = H_{0изм} \cdot K$$

где: $H_{0\ изм}$ – начальная высота столба пены, измеренная данным прибором, мм;
K – поправочный коэффициент.

$$H_5 = H_{5изм} \cdot K$$

где: $H_{5\ изм}$ – высота столба пены по истечении 5 мин, измеренная данным прибором, мм;
K – поправочный коэффициент.

Устойчивость пены (У) вычисляют по формуле:

$$У = \frac{H_5}{H_0}$$

где : H_0 и $H_{5\ изм}$ – скорректированные высоты столба пены (начальная и по истечении 5 мин), мм.

Пенообразующую способность определяют по высоте столба пены в миллиметрах, измеренной через 30 с, а устойчивость пены определяют по высоте столба пены, измеренной через 5 мин.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов трех определений, допустимые расхождения между которыми не должны превышать 10 мм.

Нормативные требования по пенообразующей способности и устойчивости пены приводят в фармакопейной статье или нормативной документации.

Седиментационная устойчивость. Испытание проводят для шампуней лекарственных суспензионного и комбинированного типа в соответствии с требованиями ОФС «Суспензии». Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, время ресуспендирования должно составлять не более 30 с.

Микробиологическая чистота. Все шампуни лекарственные должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

Масса (объем) содержимого упаковки. Испытание проводят в

соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Как правило, упаковка шампуней лекарственных представляет собой полимерные флаконы или саше (пакетики) из ламинированной фольги или полимерных материалов.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности лекарственного препарата, при температуре не выше 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Эликсиры	**ОФС.1.4.1.0042.18**
	Вводится впервые

Эликсиры – жидкая лекарственная форма, предназначенная для приема внутрь, представляющая собой спирто-водные извлечения из одного или нескольких видов лекарственного растительного сырья и/или смесь настоек и/или экстрактов, с добавлением вспомогательных веществ (в том числе корригентов вкуса и запаха, антимикробных консервантов), а также с добавлением или без добавления других действующих веществ.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Эликсиры могут быть получены двумя способами. Один из них представляет собой экстракцию одного или нескольких видов лекарственного растительного сырья спиртом этиловым различной концентрации. Другой способ состоит в смешивании предварительно полученных спирто-водных извлечений из лекарственного растительного сырья, как правило, представляющих собой настойки и/или экстракты. Оба способа получения эликсиров предполагают добавление вспомогательных веществ и, при необходимости, действующих веществ, к полученному спирто-водному извлечению.

Обязательными компонентами эликсиров являются такие вспомогательные вещества как корригенты вкуса, ароматизаторы и антимикробные консерванты. В качестве корригентов вкуса и ароматизаторов в эликсиры могут быть добавлены сахара и/или сахарный колер и/или мед, сок; в качестве антимикробных консервантов используют метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, а также другие корригенты вкуса, ароматизаторы, антимикробные консерванты и

необходимые вспомогательные вещества, разрешенные для применения внутрь.

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

ИСПЫТАНИЯ

Эликсиры должны соответствовать общим требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

Описание. Эликсиры, как правило, представляют собой прозрачную жидкость, имеющую характерный цвет и запах. Допускается наличие опалесценции; в ряде случаев, особенно в процессе хранения, возможно образование незначительного осадка.

Приводят описание внешнего вида эликсира с указанием прозрачности или опалесценции, цвета и запаха.

Спирт этиловый. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах» и нормативными указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

Метанол и 2-пропанол. Испытание проводят для эликсиров, в состав которых входят настойки. Определение проводят методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС «Определение метанола и 2-пропанола». Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, допустимое содержание должно составлять не более 0,05 % для метанола и не более 0,05 % для 2-пропанола.

Плотность. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и нормативными указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

pH. Испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации**.** Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Допустимый интервал значений pH эликсира должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тяжелые металлы. Испытание проводят для эликсиров, в состав которых входят спирто-водные извлечения, полученные экстракцией одного или нескольких видов лекарственного растительного сырья спиртом этиловым. Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. Все эликсиры должны выдерживать требования ОФС «Микробиологическая чистота».

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

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Многодозовая упаковка эликсиров может быть снабжена средством дозирования, представляющим собой мерную ложку, мерный стаканчик, мерный колпачок, шприцевой дозатор и др., для отмеривания предписанной дозы лекарственного препарата.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Для эликсиров, в которых возможно образование опалесценции или незначительного осадка, 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 15 до 25°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

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.

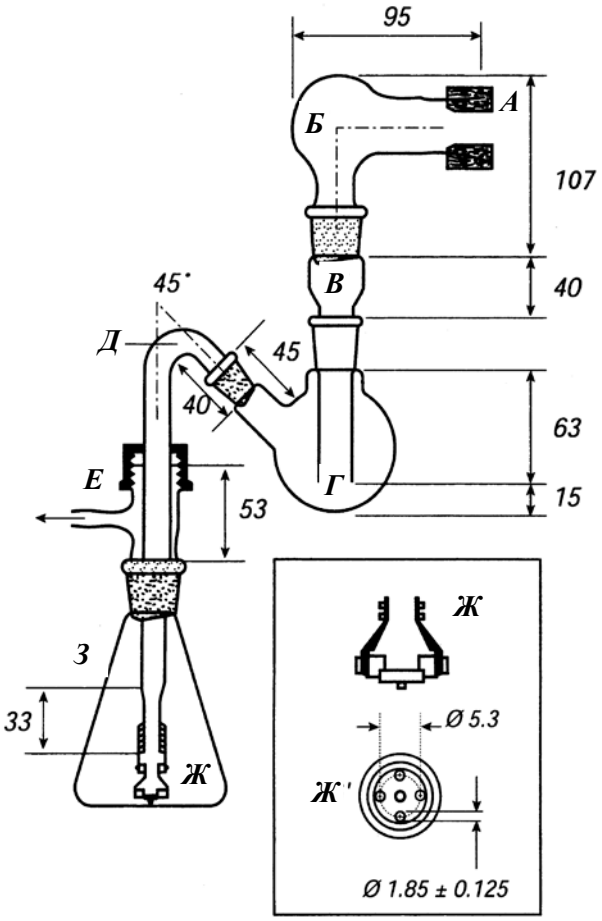


Рис. 1 – Стеклянный импинджер

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 импинджеру. 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.

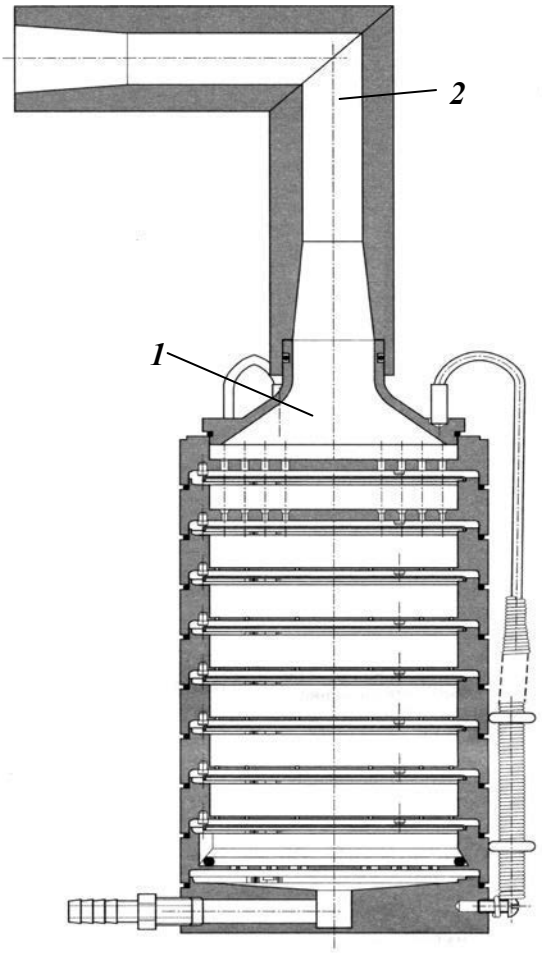


Рис. 2 – Каскадный импактор Андерсена в конфигурации для анализа аэрозолей

Таблица 2 – Размеры и количество отверстий в каскадном импакторе Андерсена

Ступень	Количество отверстий	Диаметр отверстий, мм
0	96	2,550 ± 0,025
1	96	1,890 ± 0,025
2	400	0,9140 ± 0,0127
3	400	0,7110 ± 0,0127
4	400	0,5330 ± 0,0127
5	400	0,3430 ± 0,0127
6	400	0,2540 ± 0,0127
7	201	0,2540 ± 0,0127

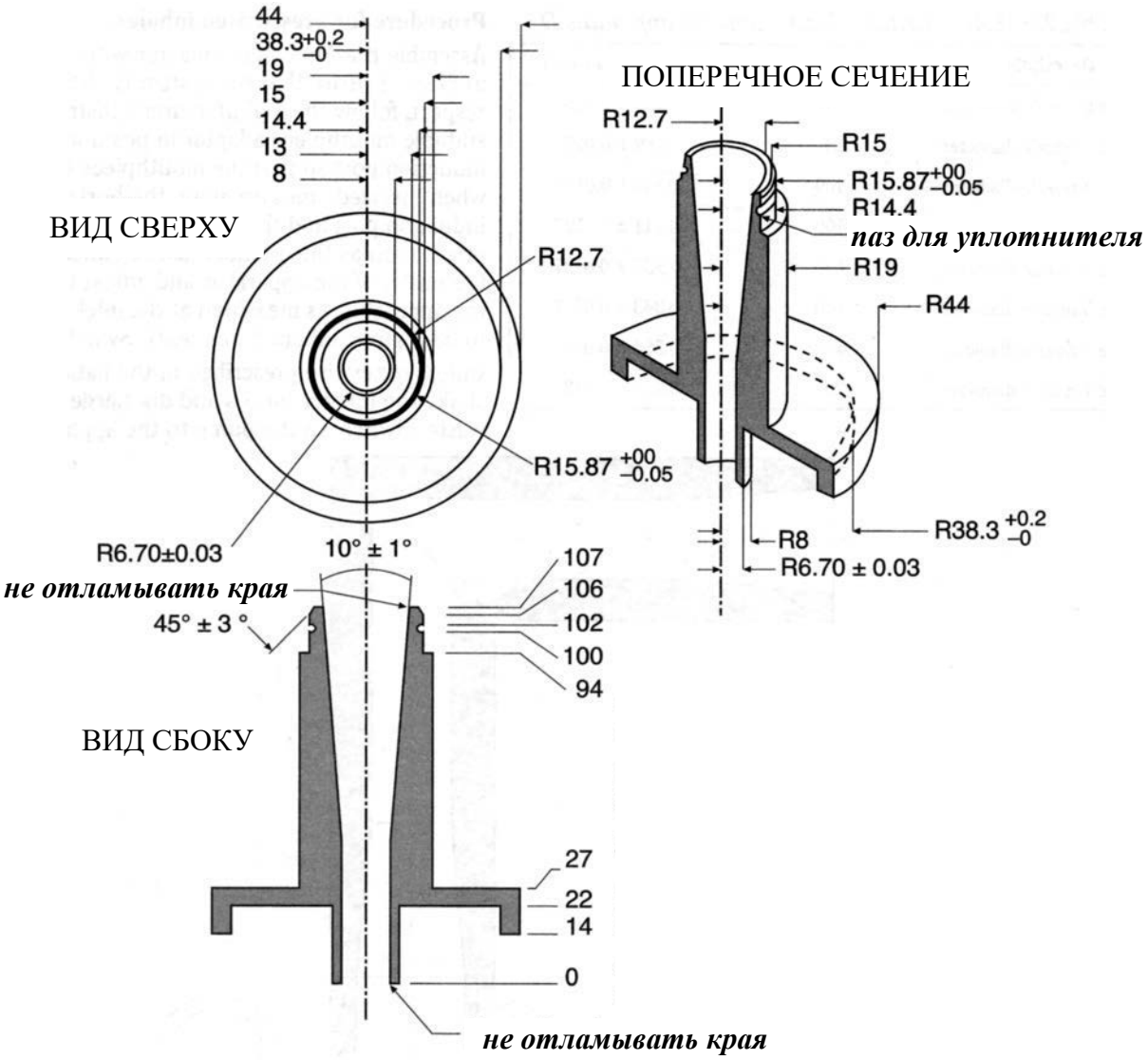


Рис. 3 – Пресепаратор для каскадного импактора Андерсена

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±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 респирабельной 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, $Q_{исх}$ (± 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 **Р2** и **Р3**, рис. 4). Соотношение Р3/Р2 должно составлять ≤ 0,5, в противном случае, производят увеличение мощности насоса и повторяют измерения.

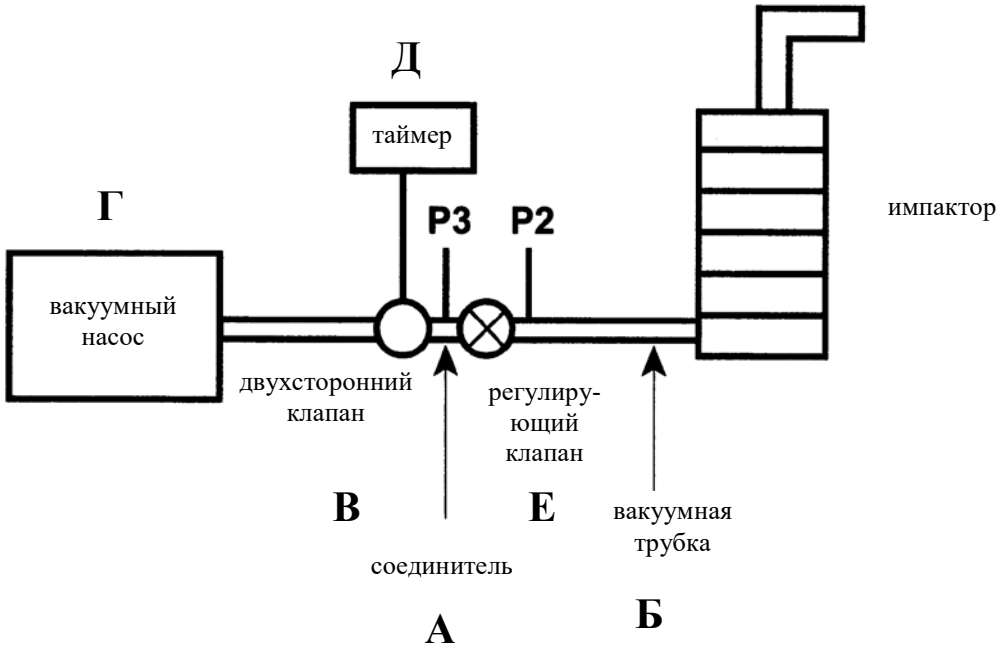


Рис. 4 – Система регулирования воздушного потока

Таблица 3 – Описание системы регулирования воздушного потока

Код	Устройство	Описание
А	Соединитель	Внутренний диаметр ≥ 8 мм, например, короткая металлическая муфта с отводом к **Р3** меньшего диаметра
Б	Вакуумная трубка	Трубка ≥ 8 ± 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
E	Регулирующий клапан	Клапан, регулирующий воздушный поток с максимальным значением Cv ≥ 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 (±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.

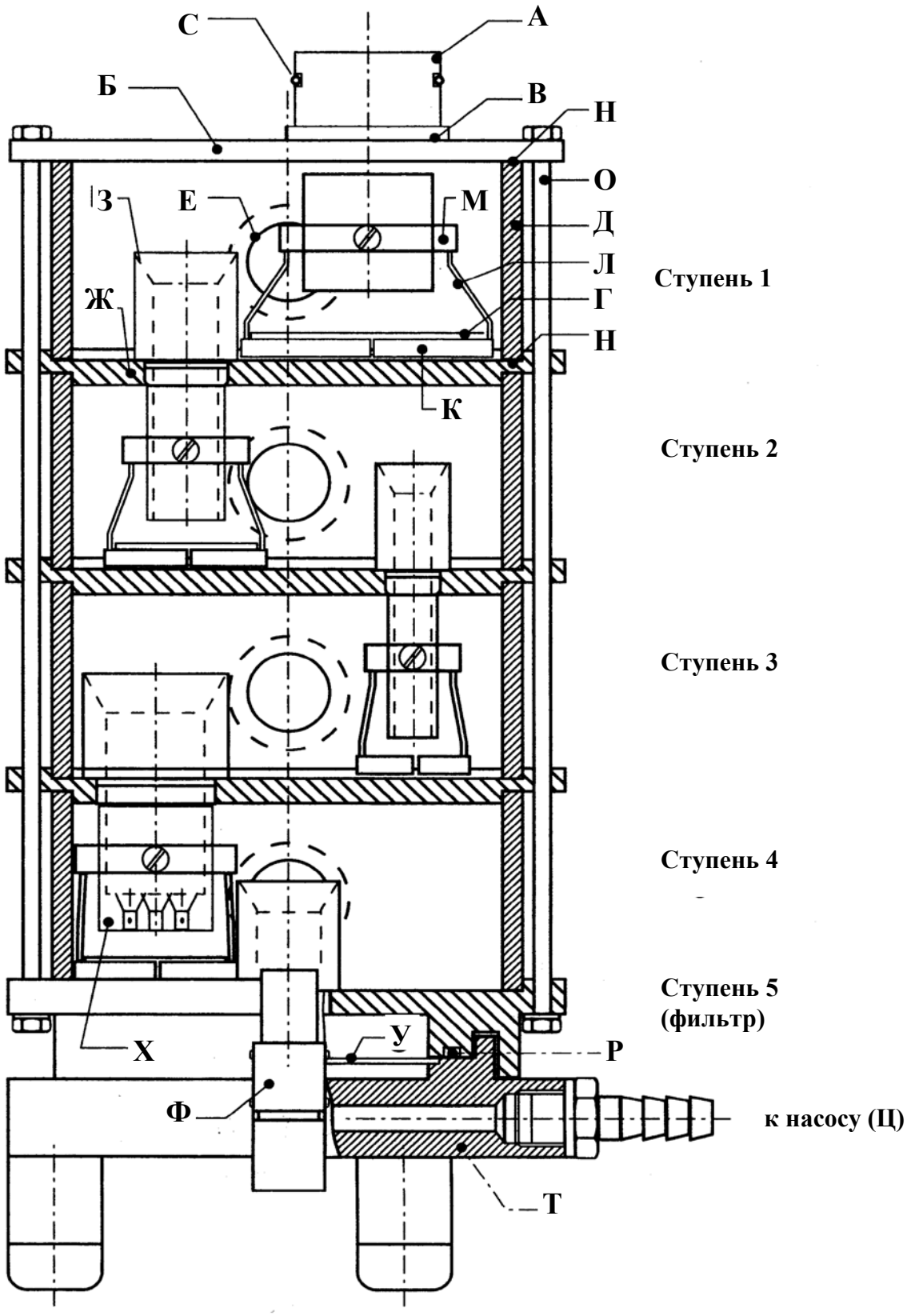


Рис. 5 – Многоуровневый жидкостной импинджер

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
		– *толщина*	см. рис. 6
В	Прокладка	Например, из ПЭТФ	должна подходить к трубке
Г	Улавливающая пластина	Пористый круглый диск из тугоплавкого стекла	-
		– *диаметр*	см. рис. 6
Д	Стеклянный цилиндр	Стеклянная трубка с ровными полированными поверхностями	-
		– *высота вместе с прокладками*	46
		– *внешний диаметр*	100
		– *толщина стенок*	3,5
		– *диаметр отверстия для отбора пробы (**Е**)*	18
		– *крышка отверстия для отбора пробы*	ISO 24/25
К	Металлическая рамка	L-образная круговая рамка с щелью	-
		– *внутренний диаметр*	должен подходить к улавливающей пластине
		– *высота*	4
		– *толщина горизонтальной секции*	0,5
		– *толщина вертикальной секции*	2
Л	Проволока	Стальная, соединяющая металлическую рамку и втулку (два для каждой рамки)	-
		– *диаметр*	1
М	Втулка	Металлическая втулка, закреплённая на трубке резьбовым соединением	-
		– *внутренний диаметр*	должен подходить к трубке
		– *высота*	6
		– *толщина*	5
Н	Сальник	Прокладка, например, силиконовая	должна подходить к стеклянному цилиндру
О	Болт	Металлический болт с гайкой (6 пар) длиной	205
		– *диаметр*	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			

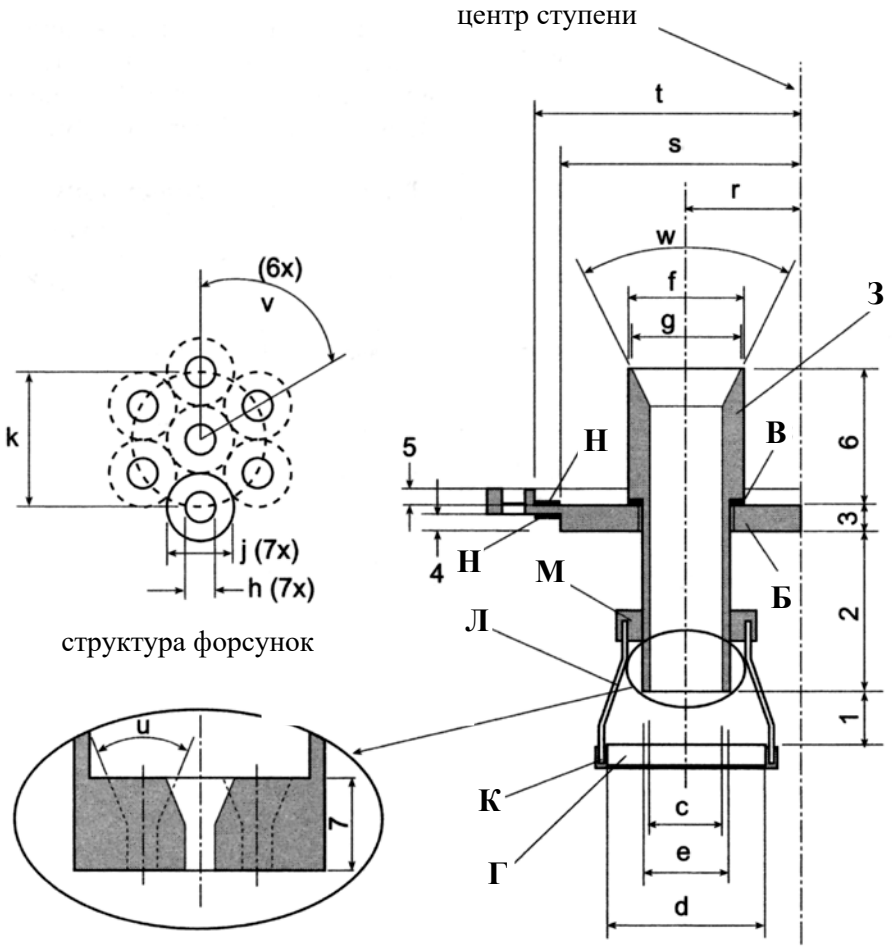


Рис. 6 – Детальная схема трубок и улавливающих пластин
На вставках представлена насадка с набором форсунок.

Таблица 5 – Размеры[1] 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.

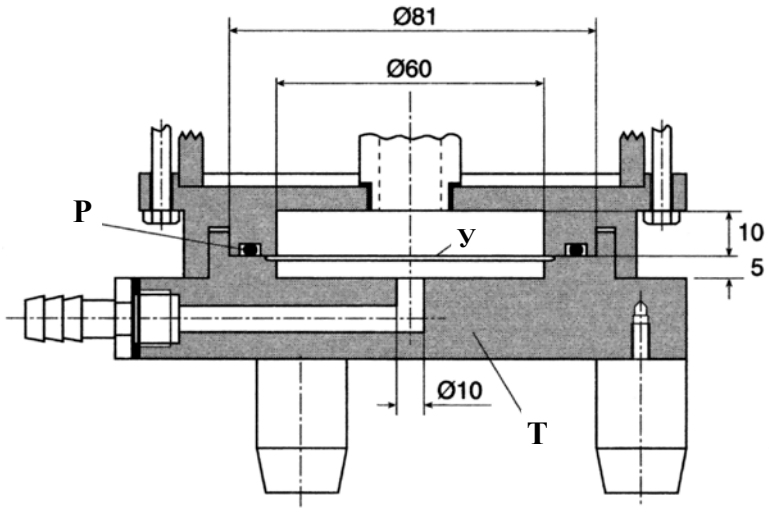


Рис. 7 – Детальное изображение держателя фильтра. Спецификации компонентов приведены в табл. 4. *Размеры приведены в мм*

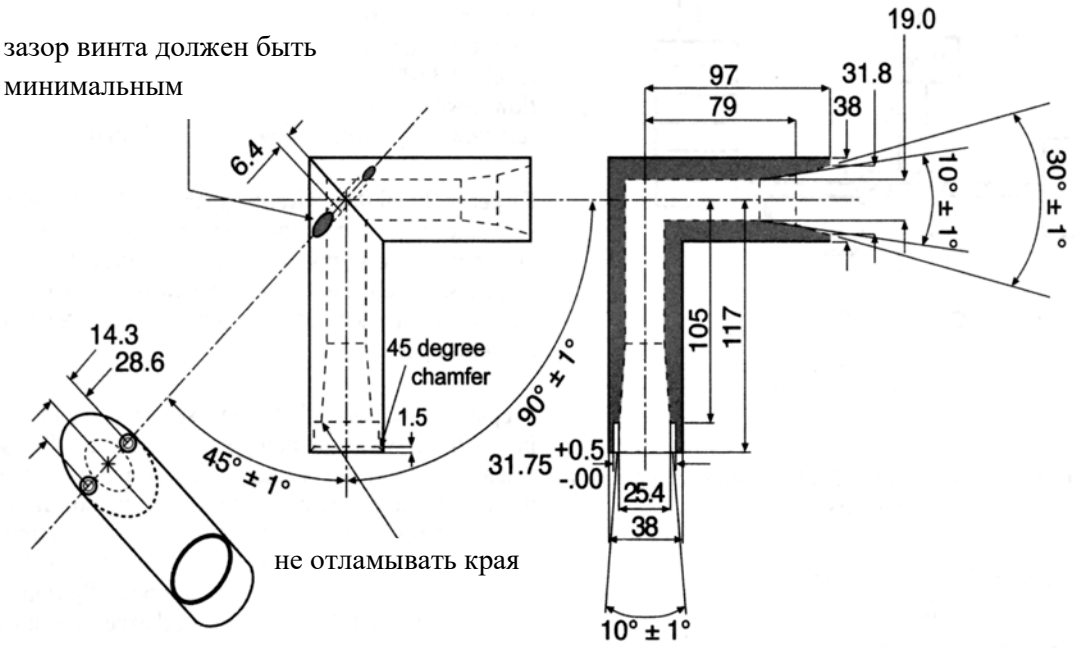


Рис. 8 – Детальное изображение входного порта
Размеры приведены в мм, если не обозначено иначе

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 ± 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 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

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 Т (± 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 *а* на рис. 13)	12,80 ± 0,05
Ступень 1 (рис. 12). Диаметр форсунки	14,30 ± 0,05
Ступень 2 (рис. 12). Диаметр форсунки	4,88 ± 0,04
Ступень 3 (рис. 12). Диаметр форсунки	2,185 ± 0,02
Ступень 4 (рис. 12). Диаметр форсунки	1,207 ± 0,01
Ступень 5 (рис. 12). Диаметр форсунки	0,608 ± 0,01
Ступень 6 (рис. 12). Диаметр форсунки	0,323 ± 0,01
Ступень 7 (рис. 12). Диаметр форсунки	0,206 ± 0,01
Микродиафрагменный сборник (рис. 12)	около 0,070
Глубина чашки (размер *б* на рис. 11)	14,625 ± 0,10
Шероховатость поверхности чашек для сбора	0,5 – 2 мкм
Ступень 1. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	0 ± 1,18

Описание	Размер, мм
Ступень 2. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	5,236 ± 0,736
Ступень 3. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	8,445 ± 0,410
Ступень 4. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	11,379 ± 0,237
Ступень 5. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	13,176 ± 0,341
Ступень 6. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	13,999 ± 0,071
Ступень 7. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* на рис. 11)	14,000 ± 0,071
Микродиафрагменный сборник. Расстояние от форсунки до уплотнителя корпуса (размер *в* 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.

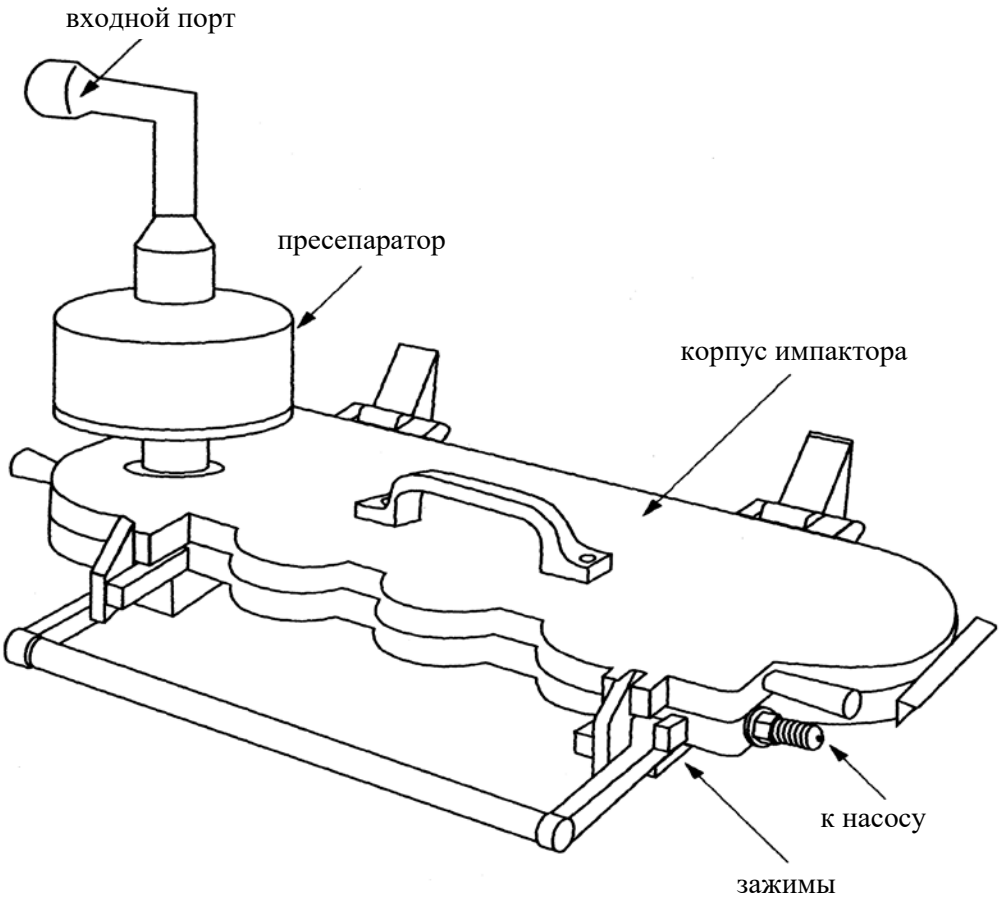


Рис. 9 – Общий вид каскадного импактора нового поколения (с пресепаратором)

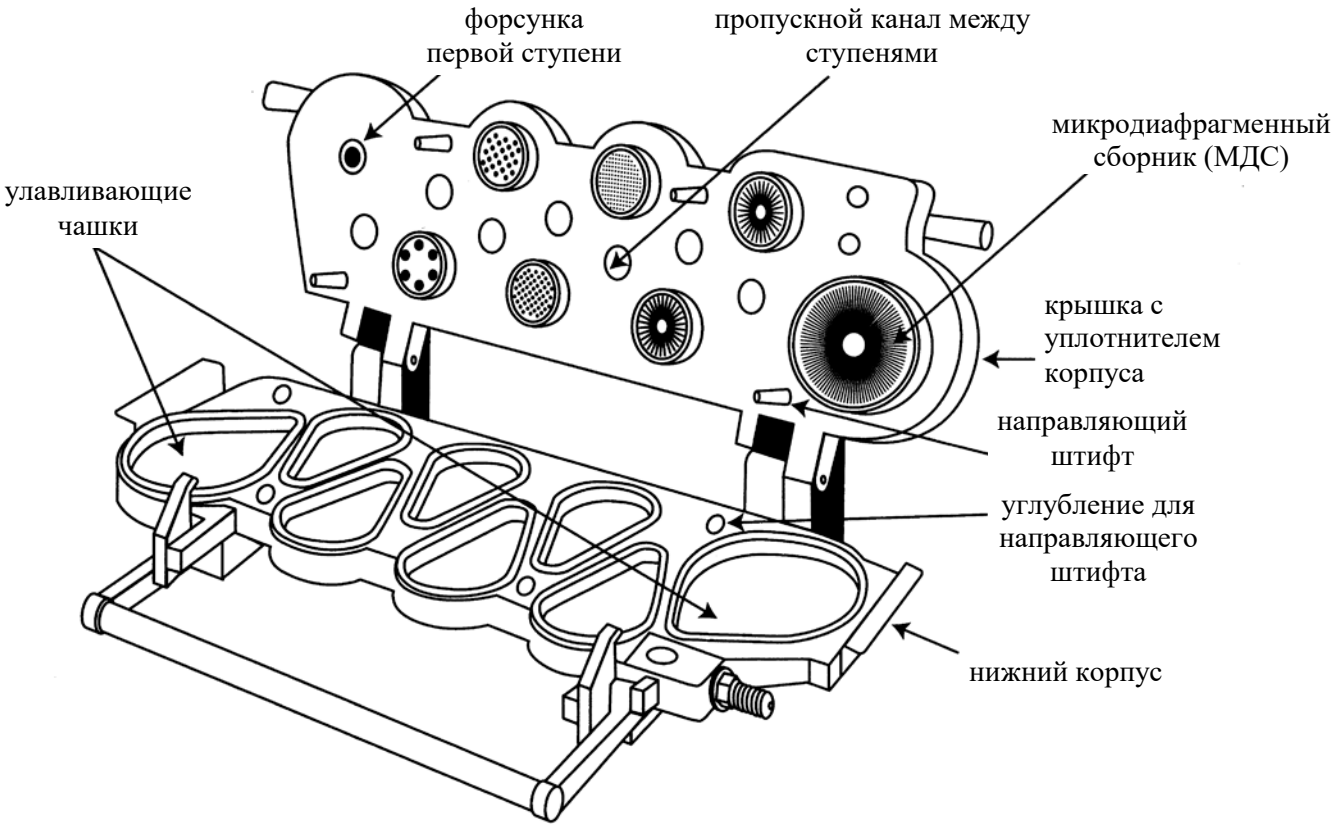


Рис. 10 – Общий вид каскадного импактора нового поколения с компонентами

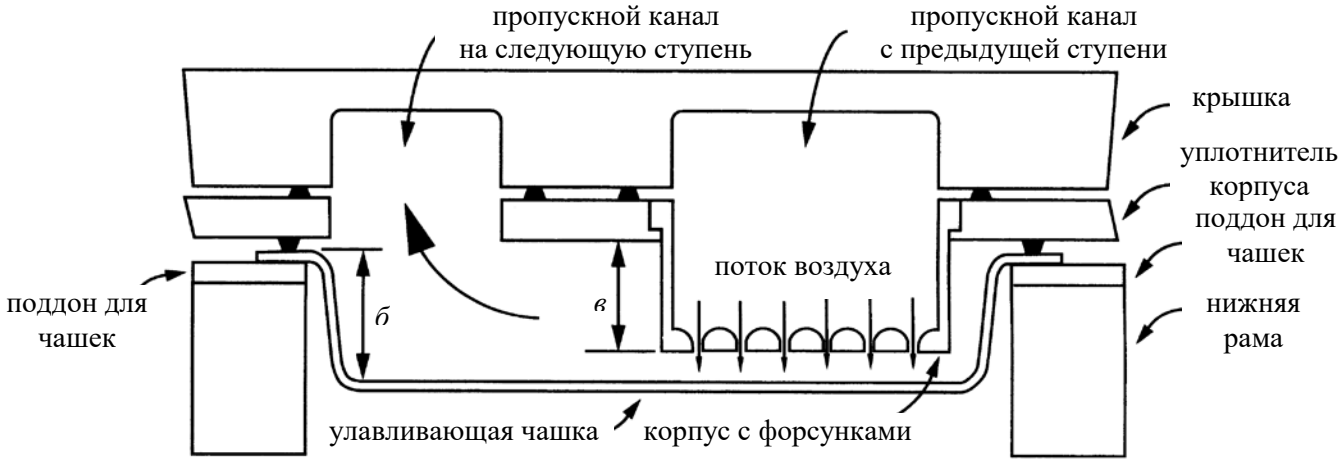


Рис. 11 – Схема межступенчатых каналов каскадного импактора нового поколения

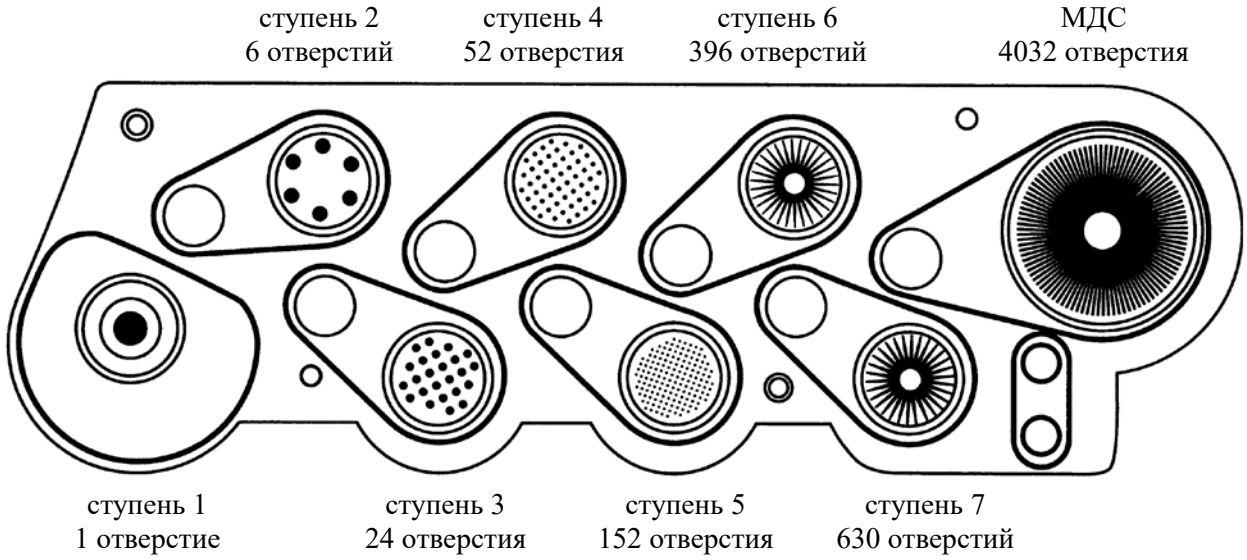


Рис. 12 – Конфигурация форсунок импактора нового поколения

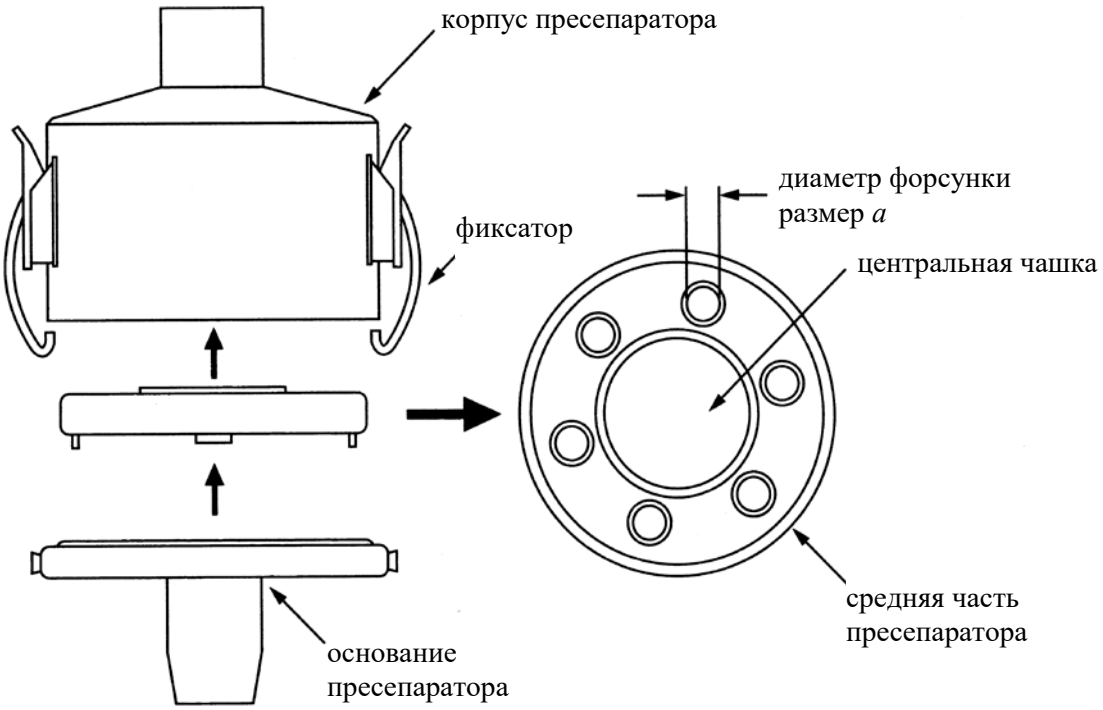


Рис. 13 – Пресепаратор для каскадного импактора нового поколения

Методика для аэрозолей (дозированных ингаляционных лекарственных форм, находящихся под давлением)

Собирают прибор без пресепаратора. Помещают улавливающие чашки в соответствующие гнёзда 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 (± 5 %). Настраивают клапан регулировки скорости потока воздуха для достижения устойчивого потока воздуха через систему с требуемой скоростью с отклонением не более ± 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 гнёзда 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 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:

$$Q_{исх} = \frac{Q_{вх} \cdot P_0}{P_0 - \Delta P}, \quad (2)$$

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, $Q_{исх}$ (± 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 ≤ 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 (± 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.

Извлекаемый объём **ОФС.1.4.2.0002.18**

Взамен ОФС.1.4.2.0002.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на жидкие лекарственные формы для приёма внутрь, за исключением лекарственных препаратов в лекарственных формах капли, сиропы, эликсиры, соки и лекарственных средств в лекарственных формах настойки, экстракты жидкие. 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 однодозовых 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 объёма. 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 однодозовых. После исчезновения воздушных пузырьков измеряют объём жидкости в каждом цилиндре.

Для однодозовых препаратов малого объёма извлекаемый объём может быть определён 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 объём.

Лекарственный препарат считается прошедшим испытание, если соблюдены следующие критерии.

Для недозированных препаратов. Среднее значение объёма содержимого 10 упаковок должно быть не менее 100 %, и ни одна из упаковок не должна иметь объём менее 95 % от указанного на этикетке.

Если среднее значение объёма содержимого 10 упаковок менее 100 % от указанного на этикетке, но ни одна из упаковок не имеет объём менее 95 % или среднее значение объёма содержимого 10 упаковок составляет 100 % и объём не более чем одной упаковки менее 95 %, но не менее 90 % от указанного на этикетке, то выполняют испытание на 20 дополнительных упаковках.

Среднее значение объёма содержимого 30 упаковок должно составлять не менее 100 % от объёма, указанного на этикетке, и объём не более чем одной из 30 упаковок может быть менее 95 %, но не менее 90 % от указанного на этикетке.

Для однодозовых препаратов. Среднее значение объёма содержимого

10 упаковок должно быть не менее 100 % и объём каждой из 10 упаковок должен находиться в интервале от 95 до 110 % от объёма, указанного на этикетке.

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.

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.

Истираемость таблеток **ОФС.1.4.2.0004.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып. 2

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.

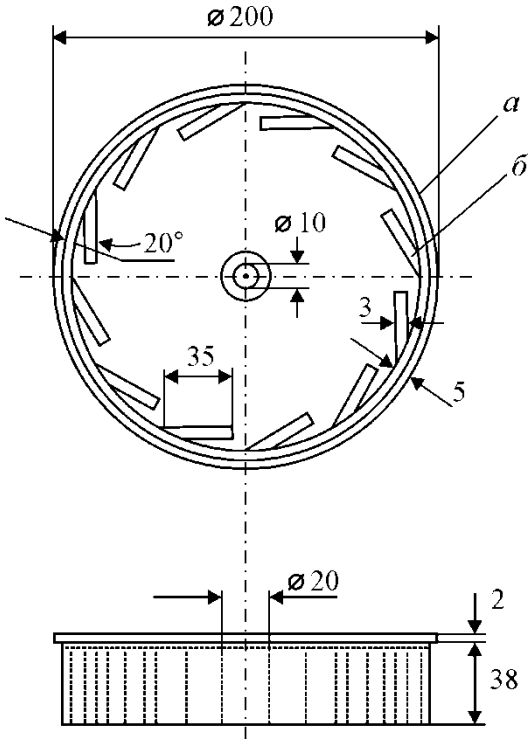


Рис. 1 – Прибор для определения истираемости таблеток
а – барабан, *б* – лопасть
Размеры указаны в миллиметрах

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 ± 4,0 мм и глубиной 38,0 ± 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 ± 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.

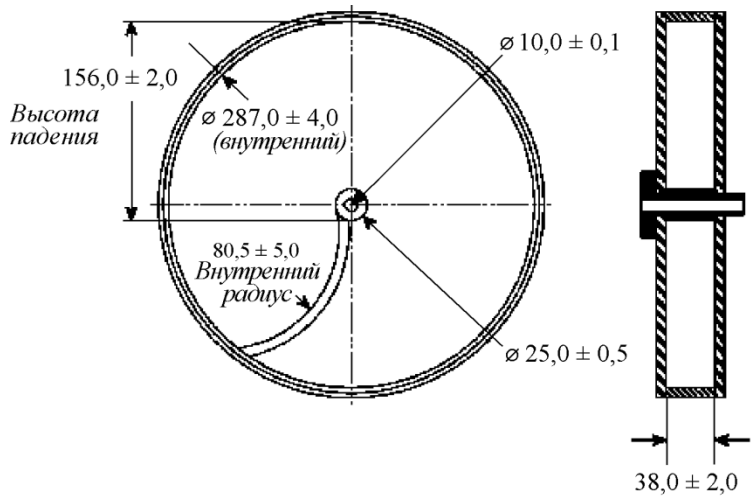


Рис. 2 – Прибор для определения истираемости таблеток
Размеры указаны в миллиметрах

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.

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

ОФС.1.4.2.0005.18

Взамен ОФС.1.4.2.0005.15

Испытание предназначено для визуальной оценки парентеральных и глазных лекарственных форм на наличие видимых механических включений, для которых предусмотрена оценка содержания механических включений в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Глазные лекарственные формы».

Для оценки содержания видимых механических включений могут использоваться другие валидированные методы, адекватность которых должна быть подтверждена материалами исследований.

Для препаратов, требующих нестандартных условий проведения испытания и критериев оценки, методика и нормативные требования должны быть обоснованы.

Испытанию подвергаются лекарственные средства, находящиеся в процессе производства (или изготовления), на заключительной стадии производства, при выпуске, а также при контроле третьей стороной.

Испытание лекарственных препаратов в ёмкостях из непрозрачных материалов проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейных статьях и нормативной документации.

Требования данной статьи не распространяются на суспензии и эмульсии, гели, имплантаты, лекарственные препараты с высокой вязкостью.

Испытание не проводят для интенсивно окрашенных жидкостей, степень окраски которых не может быть определена.

Видимые механические включения (далее механические включения) – посторонние подвижные нерастворимые частицы (кроме пузырьков газа), случайно присутствующие в лекарственных препаратах для парентерального применения и глазных лекарственных формах, видимые невооруженным глазом.

Выборка – число ёмкостей, которые необходимо отобрать от каждой серии анализируемой продукции для проведения испытания.

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 света с соответствующим отражателем. Интенсивность освещения в точке контроля должна быть от 2000 до 3750 люкс (для цветных стеклянных и прозрачных пластмассовых ёмкостей предпочтительнее использовать более высокие мощности света).

Зона испытания при просмотре должна быть освещена электрической лампой накаливания или лампой дневного света соответствующей мощности, указанной в табл. 1.

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 ёмкостях из светозащитного стекла или окрашенные растворы в ёмкостях из бесцветного стекла, а также опалесцирующие или вязкие жидкие лекарственные препараты в ёмкостях из прозрачных полимерных материалов.

2. При просмотре на установках типа KVLC-10 допускается использование электрической лампы накаливания мощностью 40 Вт.

Условия проведения испытания

Помещение для проведения испытаний (помещение класса «D») защищают от прямого попадания солнечного света.

Для жидких лекарственных форм допускается механизированная подача ёмкостей в зону контроля с последующей их транспортировкой на дальнейшие стадии контроля, а также использование различных типов специальных установок для просмотра, обеспечивающих качество испытаний согласно настоящей общей фармакопейной статье.

Поверхность ёмкостей должна быть чистой и сухой.

Методика

Испытание лекарственных препаратов на механические включения проводят путем их просмотра невооруженным глазом на черном и белом фоне.

Время просмотра одной ёмкости из стекла – 3-5 с на черном и белом фоне, группы ёмкостей – 8-10 с, а группы ёмкостей из прозрачных полимерных материалов – не менее 15 с.

Отмечают наличие любых механических включений.

1. Испытание парентеральных лекарственных форм

Испытанию подвергаются жидкие и твердые лекарственные формы.

При проведении испытаний учитывается объем 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.

Количество отбираемых образцов зависит от агрегатного состояния (жидкое или твердое), объема (малый или большой) препарата, объема серии, а также от метода испытаний (разрушающий или неразрушающий).

На производстве от каждой серии произвольно отбирают выборку (для 1 и, в случае необходимости, для 2 ступени испытаний) для растворов

малого объема в соответствии с табл. 2, для растворов большого объема – в соответствии с табл. 3. Для твердых парентеральных препаратов отбирают первую полную выборку или удвоенную полную выборку в соответствии с табл. 4.

В случае испытания препаратов, требующих нестандартных методик проведения испытания или критериев оценки, допустимо применение выборок малого объема (10 единиц при одноступенчатом плане выборки) с нормой «отсутствие механических включений».

1.1. Испытание жидких парентеральных лекарственных форм

При получении жидких лекарственных форм для парентерального применения осуществляется трехкратный контроль препаратов на механические включения:

- первичный контроль – сплошной (емкости с механическими включениями отбраковываются);

- вторичный контроль – выборочный;

- заключительный контроль (выборочный контроль перед маркировкой и упаковкой).

При испытаниях третьей стороной проводится выборочный контроль.

Первичному контролю подлежат все ампулы, флаконы, бутылки, картриджи, шприцы, шприц-тюбики, полимерные ёмкости и другие виды упаковок с препаратами, прошедшие стадию стерилизации или полученные в асептических условиях, перед их маркировкой и упаковкой.

Для проведения вторичного контроля от каждой серии, прошедшей первичный контроль, отбирают среднюю пробу – 5 % от серии до 2000 единиц указанных ёмкостей и 250 единиц от всех других серий. При обнаружении более 2 % анализируемых ёмкостей с механическими включениями всю серию, от которой отобрана средняя проба, возвращают для повторного первичного контроля.

Для проведения заключительного выборочного контроля отбирают среднюю пробу от каждой серии 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. 2 и 3 для препаратов малых и больших объемов, соответственно.

В других случаях (например, при испытаниях третьей стороной) минимальное количество ёмкостей для препаратов «малого объема», как правило, составляет не менее 80 шт. (должны соответствовать требованию: не более двух ёмкостей, имеющих механические включения), «большого объема» – не менее 20 шт. (должны соответствовать требованию: отсутствие ёмкостей с механическими включениями).

Количество ёмкостей, поступающих на испытания, может быть меньше и определяется правилами отбора проб в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб», при этом механические включения должны отсутствовать.

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 донышками» и просматривают на черном и белом фонах. Затем плавным движением, без встряхивания, переводят их в положение «вниз донышками» и вторично просматривают на черном и белом фонах. Отмечают наличие механических включений.

Если на первой ступени контроля количество ёмкостей, содержащих механические включения (табл. 2 и 3), равно или превышает указанное в графе 5, то всю серию бракуют; если количество таких ёмкостей меньше указанного числа в графе 5, но больше, чем в графе 4, то проводят вторую ступень контроля на таком же количестве ёмкостей анализируемой продукции, что и на первой ступени контроля.

Таблица 2 – Нормативы объемов выборок и критерии оценки для препаратов малого объема

Объем серии, шт.	Ступень контроля	Объем выборки, шт.	Количество ёмкостей с растворами малого объема, имеющими механические включения, шт.	
			Соответствует требованиям	Не соответствует требованиям
1	2	3	4	5
151 280	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	20 40	0 1	2 и более 2 и более
1201 3200	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	80 160	2 6	5 и более 7 и более
3201 10000	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	200 400	6 15	10 и более 16 и более
Свыше 10000	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	315 630	9 23	14 и более 24 и более

Таблица 3 – Нормативы объемов выборок и критерии оценки для препаратов большого объема

Объем серии, шт.	Ступень контроля	Объем выборки, шт	Количество ёмкостей с растворами большого объема, имеющими механические включения, шт.	
			Соответствует требованиям	Не соответствует требованиям
1	2	3	4	5
151 – 280	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	20 40	0 1	2 2
281 – 500	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	32 64	0 1	2 2
501 – 1200	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	50 100	0 2	2 3
1201 – 3200	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	80 160	0 3	3 4
свыше 3200	Первая / вторая Суммарно (по 2 ступеням)	125 250	1 5	4 6

Заключение о качестве анализируемой серии 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. 2 и 3.

Всю серию бракуют, если количество единиц продукции, имеющих механические включения, превышает или равно числу, указанному в графе 5 табл. 2 и 3 для суммарного объема первой и второй выборок.

1.2. Испытание твердых лекарственных форм для парентерального применения

Условия проведения испытания:

- от каждой серии произвольно отбирают первую полную выборку в соответствии с табл. 4;

- проводят подготовку образцов в помещениях класса чистоты В;

- специалист должен работать в стерильном костюме и шапочке из безворсовой ткани и резиновых перчатках, обработанных соответствующим разрешенным раствором;

- оборудование, химическую посуду и принадлежности для работы обрабатывают раствором разрешенного моющего средства (массовая доля 0,1 %), несколько раз промывают горячей водой и ополаскивают водой, не содержащей механических включений;

- вскрытие флаконов или ампул, растворение лекарственного препарата, контроль растворителя и препарата проводят в помещениях класса чистоты А (в ламинарном потоке стерильного воздуха).

Таблица 4 – Нормативы объемов выборок и критерии оценки

Группа препаратов[1,2]	Количество ёмкостей 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 - более 1 г (до 5 г включительно)	1 1	5 3	2 2	10 6	3 3	15 9
* От каждых последующих 35000 ёмкостей отбирается одна дополнительная 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 или нормативной документации.

2. Для проведения испытания в контролирующих органах (при контроле третьей стороной) отбирают удвоенное количество образцов, учитывая число выборок, вне зависимости от группы, к которой отнесен препарат. При необходимости контролирующие органы могут запросить дополнительное количество образцов, превышающее удвоенное их количество.

Подготовка образцов

Ёмкости, 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, исключающий попадание стекла в содержимое ампул.

Для растворения используют воду или другой растворитель, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации, предварительно профильтрованный через мембрану с диаметром пор не более 1,2 мкм.

Предварительно проводят визуальный контроль растворителя. Берут 10 тщательно вымытых флаконов вместимостью 10 мл и с помощью предварительно промытого медицинского шприца или фильтрующего приспособления типа «Пистолет» (или других аналогичных устройств) в каждый флакон вливают около 5 мл соответствующего растворителя. Затем

флаконы закрывают резиновыми пробками, свободными от механических включений, и просматривают как указанно выше.

Растворитель пригоден для испытания, если в 9 флаконах из 10 не обнаружено механических включений, видимых невооруженным глазом.

Введение растворителя в ёмкости (флаконы, ампулы и др.) проводят через горловину с помощью предварительно промытого медицинского шприца или фильтрующего приспособления типа «Пистолет» (или других аналогичных устройств). Допускается введение растворителя через пробку с помощью шприца с иглой № 08×40 (0,8 мм – внешний диаметр, 40 мм – длина иглы), предварительно промытой внутри и снаружи водой, не содержащей механических включений.

Растворитель вводят в количестве, достаточном для полного растворения препарата (около половины объема ёмкости), или в объеме, указанном в фармакопейной статье или в инструкции по медицинскому применению. Затем флаконы и бутылки вновь закрывают пробками.

Препарат должен быть полностью растворен при встряхивании.

Примечания

1. Легко гидролизующиеся препараты растворяют непосредственно перед проведением испытания.
2. Для высокомолекулярных соединений (белки, полисахариды, гликопротеиды и др.) в нормативной документации на препарат или в инструкции по медицинскому 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 или корпус, флаконы и бутылки – за горловины, вносят их в зону контроля в положении «вниз донышками», 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 донышками» и вторично просматривают на черном и белом фонах. Отмечают наличие любых механических включений.

Первоначально просматривают образцы первой полной выборки, объем которой зависит от количества упаковок в серии (табл. 4), и подсчитывают число механических включений в каждой ёмкости. При обнаружении в одной ёмкости свыше 5 механических включений дальнейший подсчет не производят. За результат просмотра в этом случае принимают цифру 7. Суммируют число механических включений, обнаруженных во всех ёмкостях первой полной выборки, и делят на число выборок.

При обнаружении в образцах препаратов первой полной выборки, предназначенных *для внутривенного введения*, а также 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 полную выборку в соответствии с табл. 4 и просматривают по той же методике.

При обнаружении в образцах препаратов первой полной выборки, предназначенных *для внутримышечного введения:*

- 23 механических включений и менее – серия соответствует требованиям;

- 29 механических включений и более – серию бракуют;

- от 24 до 28 механических включений – отбирают вторую полную выборку в соответствии с табл. 4 и просматривают по той же методике.

В случае контроля удвоенной полной выборки результаты первой и второй выборок суммируют.

При обнаружении в образцах препаратов, предназначенных *для внутривенного введения*, а также с указанием на этикетке «для инъекций»:

- 34 механических включений и менее – серия соответствует требованиям;

- 35 механических включений и более – серию бракуют.

При обнаружении в образцах препаратов, предназначенных *для внутримышечного введения:*

- 52 механических включений и менее – серия соответствует требованиям;

- 53 механических включений и более – серию бракуют.

При обнаружении в единичной выборке хотя бы одной частицы стекла отбирают дополнительную выборку в том же количестве.

Серию считают годной, если ни в одной из ёмкостей дополнительной выборки не обнаружено ни одной частицы стекла.

2. Испытание глазных лекарственных форм

Испытание предназначено для глазных лекарственных форм в виде капель глазных, примочек глазных, инъекционных глазных лекарственных форм, твердых лекарственных форм, предназначенных для приготовления капель глазных, пленок глазных.

Для жидких лекарственных форм на производстве осуществляют двукратный контроль на механические включения:

- первичный контроль – сплошной контроль (ёмкости с механическими включениями отбраковываются);

- вторичный контроль – выборочный контроль для готовой продукции.

Первичному контролю подлежат все ёмкости, прошедшие стадию стерилизации или полученные только в асептических условиях, перед их маркировкой и упаковкой.

Вторичный выборочный контроль осуществляется для готовой продукции. Для этого отбирают среднюю пробу – 1 % единиц продукции от серии, но не менее 50 ёмкостей с растворами глазных лекарственных препаратов.

В случае упаковки жидких глазных лекарственных форм в ёмкости из непрозрачных материалов, твердых глазных лекарственных форм в ёмкости из стекла или прозрачных полимерных материалов, а также твердых глазных лекарственных форм в ёмкости из непрозрачных материалов количество

ёмкостей, подлежащих испытанию, регламентируется предприятием-производителем.

Проведение испытания и оценка результатов

Жидкие глазные лекарственные формы

Для просмотра берут не более 5 ёмкостей из стекла за горловину и не более 7-8 ёмкостей из прозрачных полимерных материалов за колпачки, вносят в зону контроля «вверх донышками» и просматривают на черном и белом фонах. Затем плавным движением, без встряхивания, переводят ёмкости в положение «вниз донышками» и вторично просматривают на черном и белом фонах.

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 ёмкостей. Отобранные образцы перед вскрытием обмывают снаружи 3 раза водой, не содержащей механических включений. Промытые образцы высушивают в ламинарном потоке воздуха. Вскрывают ёмкости в помещениях класса чистоты А, переносят содержимое каждой ёмкости 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 лекарственные формы, предназначенные для приготовления капель глазных в ёмкостях из стекла или прозрачных полимерных материалов – испытание проводят в соответствии с требованиями, описанными в разделе 1.2; отбирая среднюю пробу в количестве 10 ёмкостей.

Твердые лекарственные формы, предназначенные для приготовления капель глазных в ёмкостях из непрозрачных материалов – испытание проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Пленки глазные – испытание проводят в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

При просмотре фиксируют количество ворсинок в каждой единице продукции.

В случае обнаружения в единице продукции хотя бы одной твердой частицы или более 5 ворсинок проводят повторный контроль на удвоенном количестве (других) образцов.

В случае обнаружения хотя бы в единице продукции частичек стекла – серия бракуется.

При обнаружении в единице продукции удвоенного количества образцов 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 (выборочный) контроль единиц продукции.

Серия считается годной для препаратов:

- во флаконах, если коэффициент дефектности не превышает 1,5;

- в тюбик-капельницах, если во взятом на просмотр количестве тюбик-капельниц не более 4 % единиц продукции, содержащих механические включения (при этом в каждом тюбике-капельнице не должно быть более 5 ворсинок).

Глазные лекарственные формы с опалесценцией не бракуются в случае, если опалесценция допускается фармакопейной статьей или нормативной документацией.

Испытания лекарственных форм для парентерального применения и капель глазных при изготовлении в аптеке

Осуществляется сплошной контроль на механические включения всех ёмкостей с растворами для парентерального применения и каплями глазными в соответствии с вышеприведенными методиками. Все ёмкости подвергаются

контролю дважды: до стерилизации (после приготовления и укупорки) и после стерилизации – до маркировки.

Механические включения в каждой ёмкости должны отсутствовать. Ёмкости, содержащие механические включения, отбраковываются.

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. Стеклянную посуду и оборудование для фильтрования, за исключением мембранных фильтров, осторожно промывают теплым раствором детергента 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 соответствующего 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 испытуемых 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 пригодными 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 ±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 механических 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 определять 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.

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 °С 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.1.4.2.0008.18**

Взамен ОФС.1.4.2.0008.15

Данное испытание применимо к дозированным лекарственным формам (таблеткам, капсулам, суппозиториям и др.) и лекарственным формам в однодозовых индивидуальных упаковках (гранулам, порошкам и др.), содержащим как одно, так и несколько действующих веществ.

Дозированными единицами называют дозированные лекарственные формы, содержащие одну или часть дозы действующего вещества в каждой дозированной единице.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, данное испытание не проводят для растворов, суспензий, эмульсий и гелей в однодозовых индивидуальных упаковках, предназначенных для местного и наружного применения. Данному испытанию, как правило, не подвергают витаминные лекарственные препараты; лекарственные препараты, содержащие микроэлементы; содержащие активные компоненты растительного или животного происхождения и другие лекарственные препараты при наличии соответствующего обоснования.

Целью испытания на однородность дозирования является контроль равномерности распределения действующего вещества (веществ) по отдельно взятым единицам дозированной лекарственной формы. Результаты испытания позволяют количественно оценить показатели, характеризующие разброс в содержании одного или нескольких действующих веществ по отдельно взятым единицам испытуемого дозированного лекарственного препарата.

Испытание на однородность дозирования лекарственных форм может быть выполнено двумя способами:

- количественным определением содержания действующего вещества по отдельности в каждой отобранной для испытания единице дозированной лекарственной формы (способ прямого определения -1);

- точным определением массы нетто каждой отобранной для испытания единицы дозированной лекарственной формы (способ расчетно-массовый-2).

Способ 1 применим для оценки однородности дозирования любых дозированных лекарственных форм и лекарственных форм в однодозовых индивидуальных упаковках.

Способ 2 применим для оценки однородности дозирования следующих лекарственных форм, указанных в таблице 1:

- растворы в однодозовых упаковках и мягких капсулах;

- твердые лекарственные формы (включая порошки, гранулы и другие твердые стерильные лекарственные формы) в однодозовых упаковках и не содержащие других действующих и вспомогательных веществ;

- твердые лекарственные формы (включая твердые стерильные лекарственные формы) в однодозовых упаковках с добавлением или без добавления действующих или вспомогательных веществ, полученные из истинных растворов путем лиофилизации в конечной упаковке, на этикетке которых указан данный способ получения препарата;

- твердые капсулы, таблетки без оболочки или таблетки, покрытые пленочной оболочкой с содержанием действующего вещества 25 мг и более или 25 % и более от массы дозированной единицы или от массы содержимоготвердой капсулы; при этом, если содержание других действующих веществ в лекарственной форме меньше указанных значений, то их однородность дозирования определяют по способу 1.

Условиями, определяющими возможность применения способа 2, являются также равномерное распределение действующего вещества по массе испытуемого препарата и предусмотренное в фармакопейной статье

или нормативной документации использование навесок усредненной пробы при количественном определении действующего вещества.

Случаи возможного применения способов 1 и 2 по отношению к различным лекарственным формам приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Применимость способов 1 и 2 для оценки однородности дозирования лекарственных форм

Наименование лекарственной формы		**Доза и массовая доля действующего вещества**	
		≥25 мг и ≥25 %	**<25 мг или <25 %**
		Способ*	
Таблетки	без оболочки	1,2	1
	покрытые пленочной оболочкой	1,2	1
	покрытые оболочкой методом дражирования или прессования	1	
Капсулы	твердые	1,2	1
	мягкие, содержащие суспензию, гель или эмульсию	1`	
	мягкие, содержащие раствор	1,2	
Гранулы и порошки в однодозовой упаковке	однокомпонентные без вспомогательных веществ	1,2	
	содержащие два и более действующих веществ и/или вспомогательные вещества	1	
Лиофилизаты в однодозовой упаковке		1,2	
Растворы в однодозовой упаковке		1,2	
Суспензии, эмульсии, гели в однодозовой упаковке, предназначенные для парентерального применения и приема внутрь		1	
Суппозитории		1	
Пластыри трансдермальные		1	

Наименование лекарственной формы		Доза и массовая доля действующего вещества	
		≥25 мг и ≥25 %	<25 мг или <25 %
		Способ*	
Другие лекарственные формы		1	

Примечание:
Способ 1 – прямое определение содержания действующего вещества.
Способ 2 – расчетное определение содержания действующего вещества по массе единиц дозированной лекарственной формы.

Определение однородности дозирования

От испытуемой серии препарата отбирают случайным образом пробу в количестве 30 дозированных единиц, из них в произвольном порядке отбирают 10 дозированных единиц для проведения первого этапа испытания. В отобранных дозированных единицах определяют содержание действующего вещества по способу 1 или способу 2. Оставшиеся 20 дозированных единиц лекарственной формы сохраняют для проведения второго этапа испытания.

Способ прямого определения

Проводят определение, как указано для данной дозированной формы. Там, где используют разные методики для количественного определения лекарственного средства и испытания однородности содержания, для результатов последнего теста можется понадобиться применение корректирующего коэффициента.

При способе 1 в каждой из 10 отобранных дозированных единиц испытуемого препарата (n = 10) определяют количественное содержание действующего вещества (веществ) по методике, приведенной в соответствующем разделе фармакопейной статьи или нормативной документации. При испытании для жидких или мягких лекарственных форм определение выполняют при тщательном перемешивании каждой упаковки.

Каждый из полученных результатов выражают в процентах (x_i) от номинального содержания действующего вещества в одной дозированной единице лекарственной формы (i – номер единицы препарата по порядку проведения анализа).

Расчетно-массовый способ

Количественное определение действующих(ого) веществ(а) проводят на репрезентативном образце серии лекарственного препарата с использованием методики, приведенной, как правило, в разделе «Количественное определение» фармакопейной статьи или нормативной документации. Допускают, что концентрация (отношение массы действующего вещества к массе дозированной единицы) однородна.

Для каждой из 10 отобранных дозированных единиц испытуемого препарата (n = 10) определяют массу (w_i) непосредственно или по разности масс заполненной и полностью опорожненной упаковки (массу нетто) с точностью взвешивания ±0,0002 г. В фармакопейной статье или нормативной документации предусматривают меры, обеспечивающие полноту удаления препарата из опорожненных упаковок, но не приводящие к изменению их масс.

Таблетки без оболочки или покрытые пленочной оболочкой. Взвешивают точно каждую из 10 отобранных таблеток. Рассчитывают содержание действующего вещества в каждой таблетке на основании массы отдельных таблеток и результата количественного определения действующего вещества.

Твердые капсулы. Взвешивают точно каждую из 10 отобранных капсул. Извлекают содержимое каждой капсулы подходящим способом, затем точно взвешивают пустую оболочку. Массу содержимого капсулы вычисляют по разности массы капсулы и массы оболочки. Рассчитывают содержание действующего вещества в каждой капсуле на основании масс содержимого капсул и результата количественного определения.

Мягкие капсулы. Взвешивают точно каждую из 10 отобранных капсул. Извлекают содержимое капсулы, разрезая ее чистым и сухим инструментом (ножницы или скальпель), промывают оболочку подходящим растворителем. Для удаления растворителя с поверхности оболочки оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин, избегая поглощения или потери влаги. Затем взвешивают оболочку и вычисляют массу содержимого капсулы. Рассчитывают содержание действующего вещества в каждой капсуле на основании масс содержимого капсул и результата количественного определения.

Другие твердые дозированные лекарственные формы. Определение проводят в соответствии с указаниями для твердых капсул.

Жидкие или мягкие дозированные лекарственные формы. Взвешивают точно количество жидкости или мягкого содержимого, извлеченное из 10 отобранных отдельных упаковок. При необходимости рассчитывают эквивалентный объем, предварительно определив плотность. Рассчитывают содержание действующего вещества в каждой упаковке на основании масс содержимого упаковок и результата количественного определения.

С использованием полученных результатов в каждой из 10 дозированных единиц препарата вычисляют содержание действующего вещества в процентах (x_i) от номинального значения:

$$x_i = w_i \cdot \frac{A}{\overline{W}} ,$$

где: i – номер единицы препарата по порядку взвешивания;

w_i – масса нетто единицы испытуемого препарата;

$\overline{W}$ – средняя масса нетто единиц испытуемого препарата;

A – содержание действующего вещества в дозируемой единице испытуемого препарата, полученное, как указано, как правило, в разделе «Количественное определение», и выраженное в процентах от номинального значения.

Примечание:

Величину A рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{B}{L} \cdot 100 ,$$

где: B – содержание действующего вещества в дозируемой единице испытуемого препарата (таблетке, капсуле, флаконе и др.), полученное как указано, как правило, в разделе «Количественное определение»;

L – номинальное содержание действующего вещества в дозируемой единице испытуемого препарата.

Вычисление показателей приемлемости. Для полученной любым из описанных способов совокупности значений x_i рассчитывают величины среднего арифметического ($\overline{X}$) и стандартного отклонения (s).

Соответственно найденной величине $\overline{X}$ выбирают эталонное значение дозы (M) и рассчитывают значения первого (AV) и при необходимости второго ($|M–x_i|_{max}$) показателей приемлемости результатов испытания по показателю «однородность дозирования».

Сведения, необходимые для проведения расчетов, выбора эталонного значения дозы и нормирования первого и второго показателей приемлемости, приведены в табл. 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, %	Результаты рассчитывают в % от номинального значения содержания действующего вещества	Определяют экспериментально (по способу 1 или 2), как указано в фармакопейной статье или нормативной документации
$\overline{X}$	Среднее арифметическое значений x_i, %	Вычисляют при $n = 10$ или $n = 30$	$\frac{\sum_{1}^{n} x_i}{n}$

Обозначение	Определение	Пояснения (условия)	Формула или значение
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, % от ее номинального значения	При 98,5 % ≤ $\bar{X}$ ≤ 101,5 %	$\bar{X}$
		При $\bar{X}$ < 98,5 %	98,5
		При $\bar{X}$ > 101,5 %	101,5
AV	Первый показатель приемлемости, %	Вычисляется соответственно значению M	$\lvert M - \bar{X}\rvert + k \cdot s$
$L1$	Максимально допустимое значение AV, %	Должно выполняться условие AV ≤ $L1$ при n = 10 или 30	15,0
$L2$	Опорное значение второго показателя приемлемости, %		25,0
$\lvert M - x_i\rvert_{max}$	Второй показатель приемлемости, %	Для величин x_i должно выполняться условие $\lvert M - x_i\rvert \le 0{,}01 \cdot L2 \cdot M$	$0{,}01 \cdot L2 \cdot M$

Примечания:

1. Указаны значения M 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 (Т > 101,5 %). Допускается также, если это предусмотрено в фармакопейной статье или нормативной документации, рассчитывать Т как процентное отношение среднего арифметического верхнего и нижнего пределов содержания действующего вещества в одной дозе препарата от номинального значения.

Величина M выбирается соответственно найденному значению $\bar{X}$:

- при 98,5 % ≤ $\bar{X}$ ≤ Т принимают $M = \bar{X}$;

- при $\bar{X} < 98{,}5\ \%$ принимают $M = 98{,}5\ \%$,

- при $\bar{X} > \text{T}$ принимают $M = \text{T}$.

С использованием принятого значения M рассчитывают первый и второй показатели приемлемости, как это указано в табл. 2.

Интерпретация результатов. Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, то результат испытания признается удовлетворительным, если при n=10 первый показатель приемлемости $\text{AV} \le L1$.

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 $\text{AV} \le L1$ и все значения x_i удовлетворяют неравенству $\left|M - x_\text{i}\right| \le 0{,}01 \cdot L2 \cdot M$.

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 однодозовым лекарственным формам в индивидуальных упаковках (гранулам, порошкам, лиофилизатам и др.). Испытание не применяют в случае, если проводят испытание по показателю «Однородность дозирования» в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования».

Испытание проводят на 20 единицах дозированной лекарственной формы или содержимом 20 индивидуальных упаковок однодозовых лекарственных форм, отобранных случайным образом.

Методика. Определяют среднюю массу взвешиванием 20 единиц дозированной лекарственной формы или содержимого 20 индивидуальных упаковок однодозовых 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 однодозовых 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 документации, 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

однодозовых 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 двух 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
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

Дозированная лекарственная форма	**Средняя масса, мг**	**Допустимое отклонение, %**
Твердые лекарственные формы для приготовления лекарственных форм для парентерального применения	Более 40 мг	10
	40 мг и менее*	–
Суппозитории	Для всех случаев	5
Примечание. *Если средняя масса равна 40 мг и менее, то лекарственная форма подлежит подлежит испытанию на однородность дозирования в соответствии с ОФС «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 ± 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).

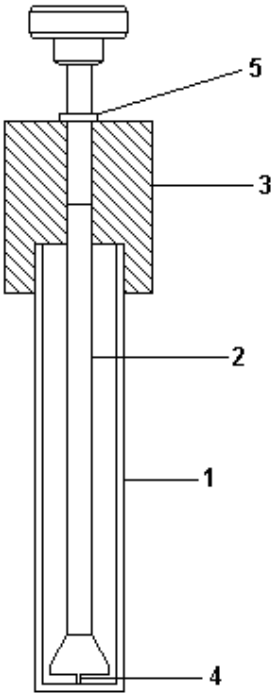


Рис. 1 – Прибор 1
1 – стеклянная трубка; 2 – стержень; 3 – поддерживающее устройство стержня; 4 – металлическая игла; 5 – маркировочное кольцо в нулевом положении

В стеклянную трубку помещают 10 мл воды и погружают ее вертикально в водяную баню с температурой (36,5 ± 0,5) °С 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 ± 0,4 г;

– проникающая вставка (Г2), состоящая из стержня массой 7,5 ± 0,1 г в штоке, который имеет расширение книзу для крепления суппозитория; обе части изготовлены из нержавеющей стали.

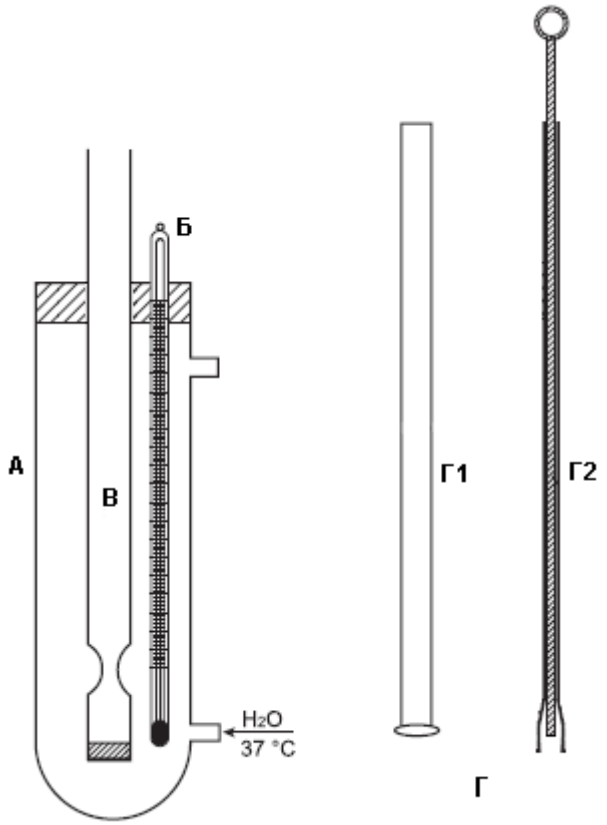


Рис. 2 – Прибор 2
А – водяная баня; Б – термометр; В – стеклянная трубка;
Г1 – стеклянный стержень; Г2 – проникающая вставка

Методика. Устанавливают и поддерживают температуру водяной бани (36,5 ± 0,5) ºС. В трубку (В) помещают 5 мл воды, нагретой до (36,5 ± 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.

Распадаемость суппозиториев и вагинальных таблеток	**ОФС.1.4.2.0012.15**
	Вводится впервые

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 нержавеющего 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 ± 0,5) °С, 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.

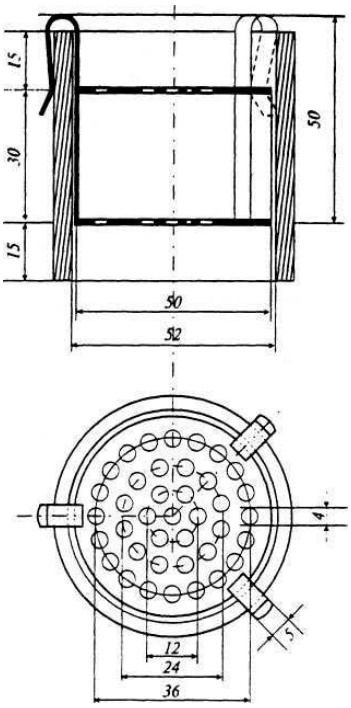


Рис. 1 – Прибор для определения распадаемости суппозиториев
Размеры указаны в миллиметрах

Методика испытания для суппозиториев. 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 прибавляют 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.

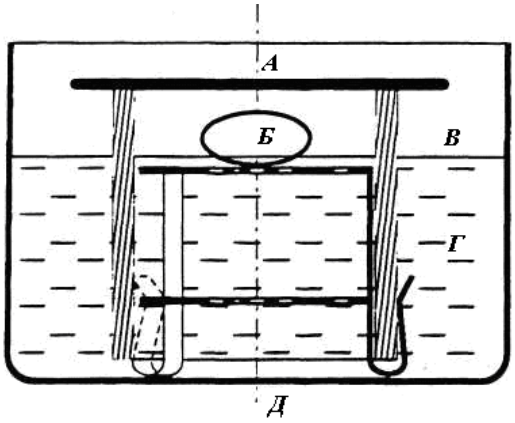


Рис. 2 – Прибор для определения распадаемости вагинальных таблеток
А – стеклянная пластинка; *Б* – вагинальная таблетка; *В* – поверхность воды; *Г* – вода; *Д* – стакан

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).

Распадаемость таблеток и капсул **ОФС.1.4.2.0013.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып. 2

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±2) °С, 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 ± 2,5 мм с внутренним диаметром 21,85 ± 1,15 мм и толщиной стенки 1,9 ± 0,9 мм. Трубки поддерживаются в вертикальном положении сверху и снизу двумя накладными пластмассовыми пластинами диаметром 90 ± 2 мм, толщиной 6,75 ± 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 ± 0,2 мм из нержавеющей стальной проволоки диаметром 0,615 ± 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.

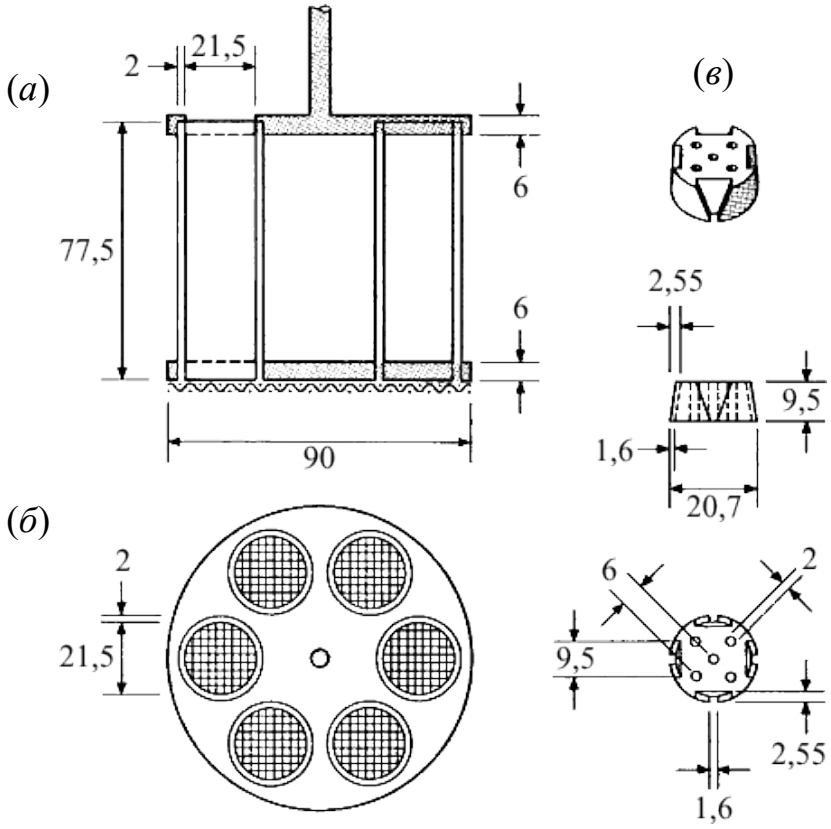


Рисунок – Устройство и размеры составных
частей прибора для определения распадаемости таблеток и капсул
Размеры указаны в миллиметрах
а – корзинка; *б* – сетчатое дно-подставка корзинки; *в* – диск

В конструкции прибора предусмотрено использование дисков. При этом каждая стеклянная трубка снабжается диском цилиндрической формы диаметром 20,7 ± 0,15 мм и высотой 9,5 ± 0,15 мм (рисунок, *в*), изготовленным из прозрачной пластмассы с плотностью от 1,18 до 1,20 г/см^3. В диске просверлены 5 параллельных отверстий диаметром 2,0 ± 0,1 мм; одно из них расположено в центре диска, остальные 4 – равномерно по кругу радиусом 6,0 ± 0,2 мм от центра диска. На боковой поверхности диска вырезаны 4 выемки трапециевидной 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 ± 0,1 мм, выемка имеет форму квадрата. Длина параллельной стороны трапеции на верхней поверхности диска составляет 9,4 ± 0,2 мм и ее середина находится на расстоянии 2,6 ± 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 проволочной 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 собой мягкую массу, которая разрушается при легком прикосновении стеклянной палочки. Наличие такого остатка должно быть оговорено в фармакопейной статье или нормативной документации.

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 высвобождаться 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 и другие твердые дозированные лекарственные формы;

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 (*А*), к нижней части которого прикреплена цилиндрическая корзинка (*Б*). 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±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 проволочной 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 сосуды 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±0,5) °С аппарат должен быть оснащен водяной баней с постоянным объемом термостатируемой жидкости.

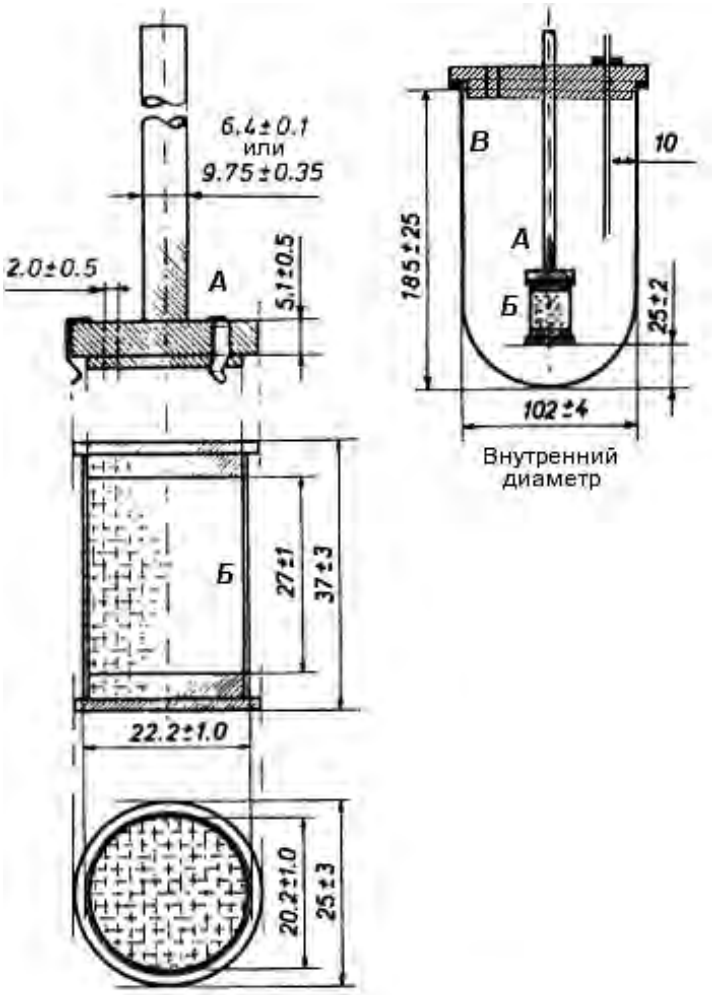


Рис. 1 – Аппарат I «Вращающаяся корзинка»
Размеры указаны в мм

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 корзинки.

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.

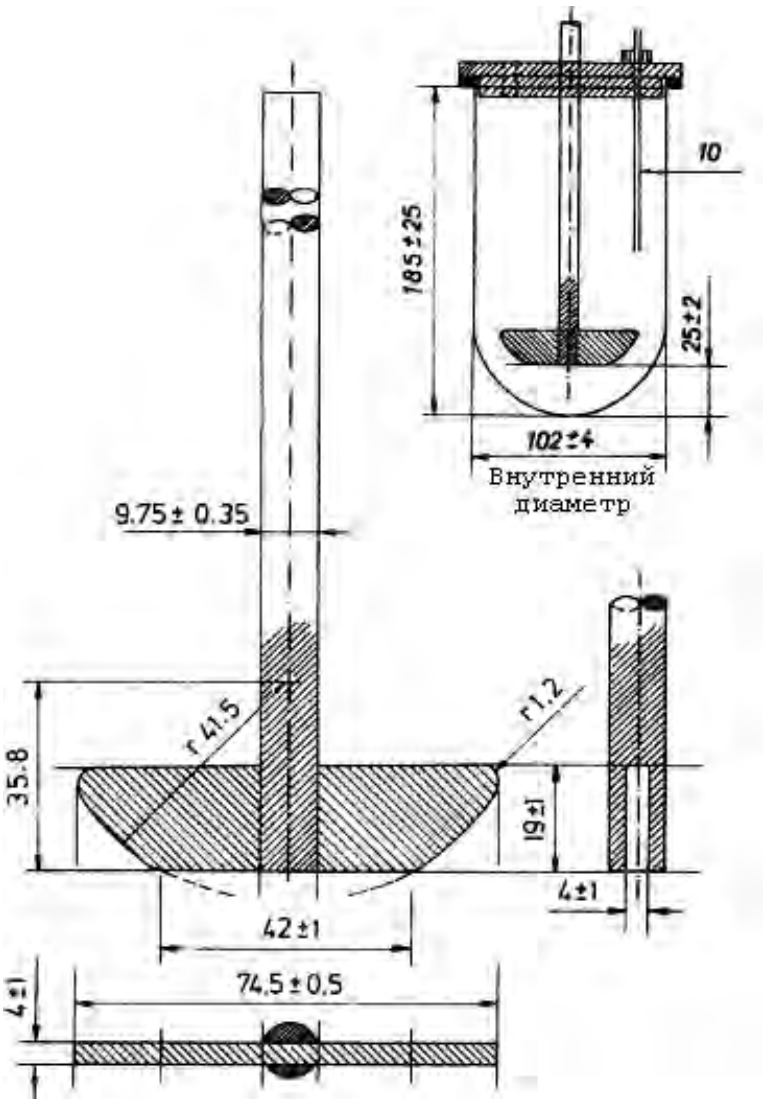


Рис. 2 – Аппарат II «Лопастная мешалка»
Размеры указаны в мм

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 ±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 ± 0,5) °С.

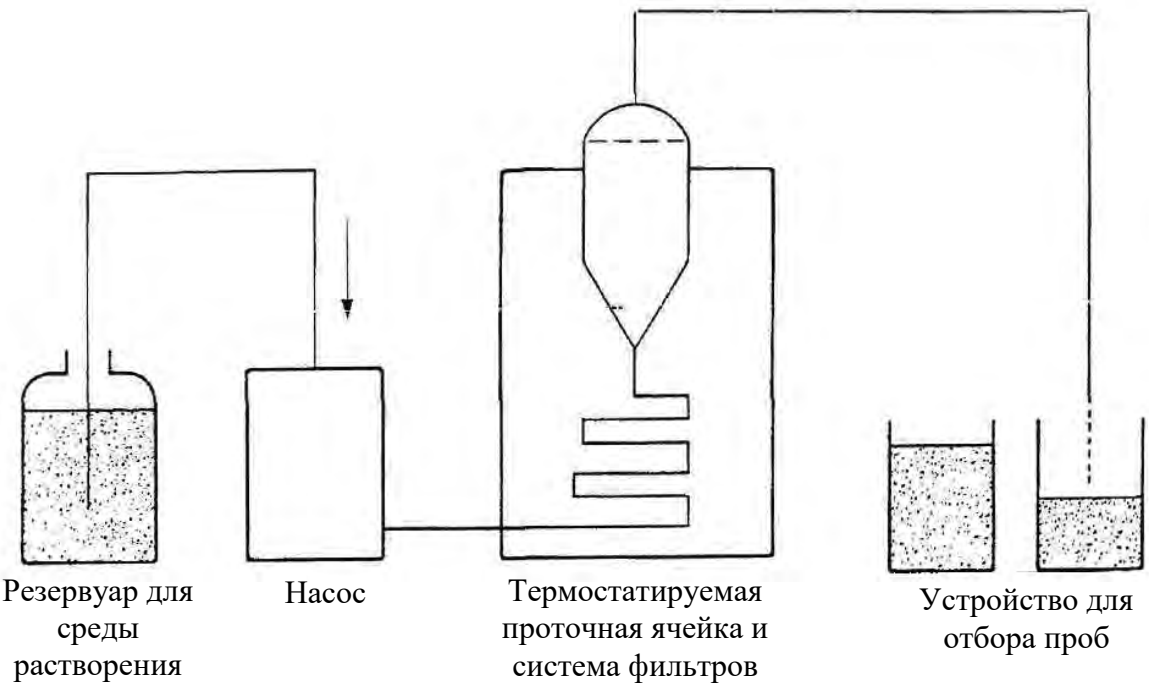


Рис. 3 – Схема аппарата III «Проточная ячейка»

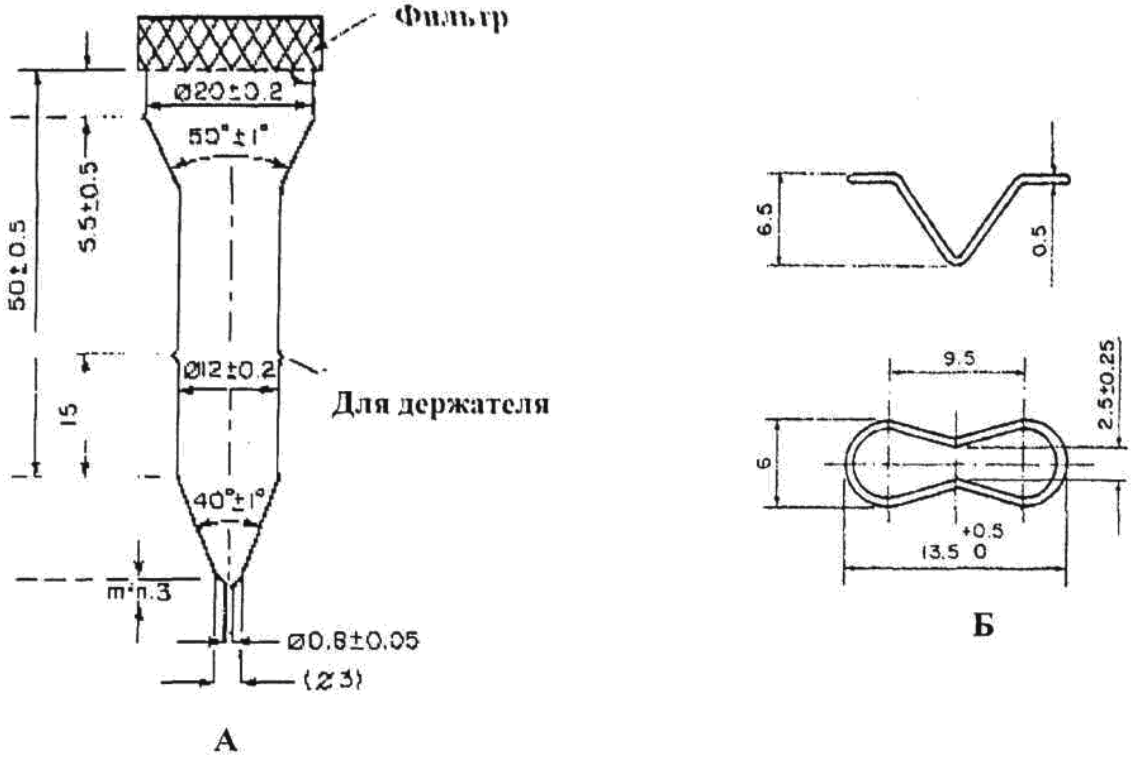


Рис. 4 – Проточная ячейка размером 12,0 мм (А) и держатель таблеток для проточной ячейки размером 12,0 мм (Б)

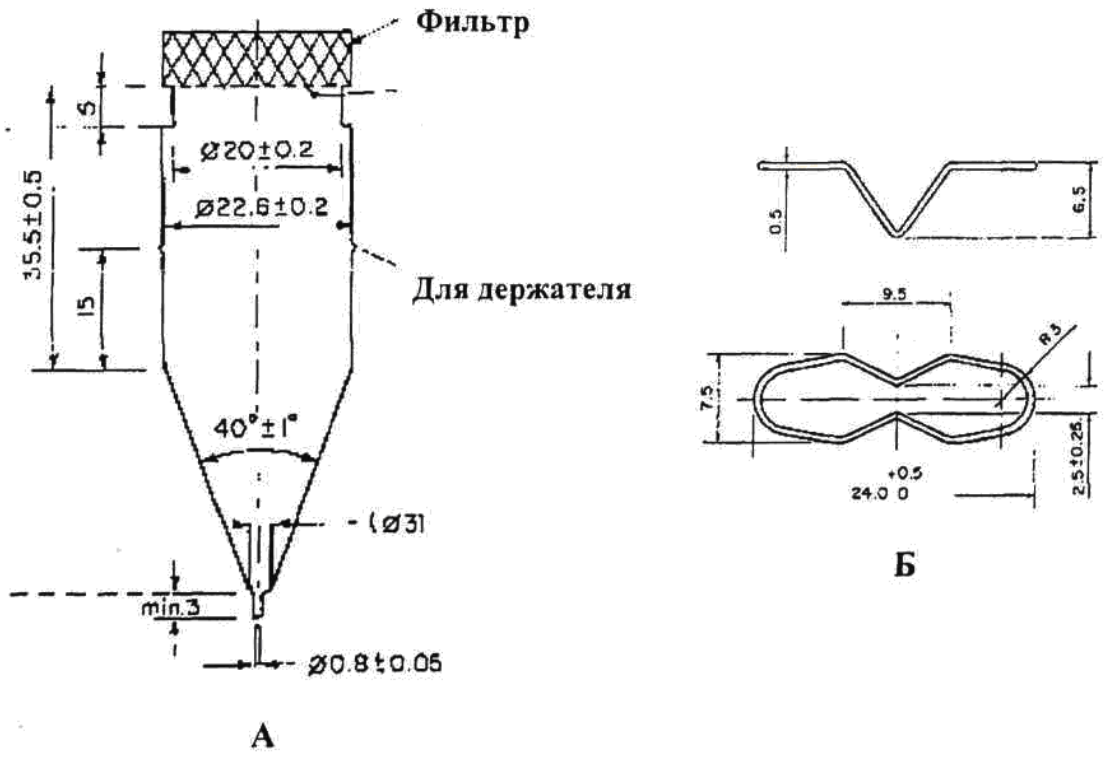


Рис. 5 – Проточная ячейка размером 22,6 мм (А) и держатель таблеток для проточной ячейки размером 22,6 мм (Б)

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 pH 6,8-7,8 (допустимое отклонение значений pH±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 pH 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 pH более 6,8, испытание повторяется в той же

среде с добавлением панкреатина (активностью 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±0,5) °С.

Перед использованием среда растворения должна быть деаэрирована. Для этого среду растворения нагревают до температуры около 41 °С, 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 ±4 % от скорости вращения, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Отбор проб

Отбор проб осуществляется из зоны сосуда для растворения, находящейся на ½ 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 ±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 действующее 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±0,5) °С.

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±0,5 мм и затем стеклянные шарики подходящего размера, обычно 1,0±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±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 ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$), температура которого составляет (37±0,5) °С (перемешивающее устройство аппарата продолжает работать). Доводят pH среды растворения до 6,80±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±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. 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 pH 6,8 (2) с температурой (37±0,5) °С. 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 pH 6,8 (2) с температурой (37±0,5) °С.

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 pH 6,8

(2). Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М и натрия фосфата раствор 0,2 М ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) смешивают в соотношении 3:1 и при необходимости доводят pH полученного раствора до 6,80±0,05 с помощью хлористоводородной 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 и другие твердые дозированные лекарственные формы.

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, имеющую температуру (37±0,5) °С, 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*

Стадия	**Число испытуемых образцов**	**Одна единица лекарственной формы**	**Объединенный образец**
S_1	6	Для каждой испытуемой 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 испытуемых 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

Ста-дия	Число испытуемых образцов	Одна единица лекарственной формы	Объединенный образец
S_3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытуемых 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 дозированные 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 испытуемых образцов**	**Одна единица или объединенный образец**
1-я стадия (кислотная)		
S_1	6	Для каждой испытуемой единицы: в среду растворения должно высвободиться не более 10 % от заявленного содержания действующего вещества
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

Стадия	Число испытуемых образцов	Одна единица или объединенный образец
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 испытуемых образцов	Одна единица или объединенный образец
1	2	3

S_1	6	Не должно быть ни одной испытуемой 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 испытуемых 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
S3	12	Среднее количество высвободившегося в среду растворения действующего вещества из 24 испытуемых 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 вещества 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

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 ± 0,5) ºС;
- насоса, перекачивающего среду растворения через проточную ячейку;
- термостатируемой проточной ячейки с системой фильтров;

- устройства для отбора проб.

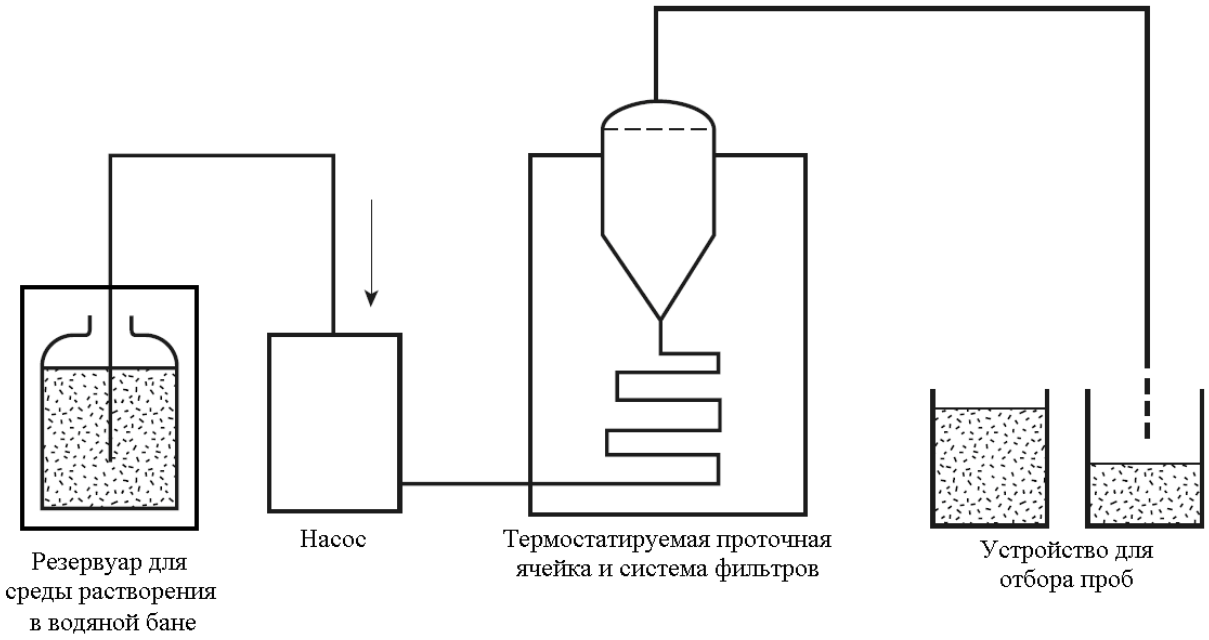


Рис. 1 – Схема прибора «Проточная ячейка»

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 наверх 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. Металлическая сетка (5) служит грубым фильтром.

III. Фильтрующая часть снабжена фильтром (6) из бумаги, стекловолокна или целлюлозы.

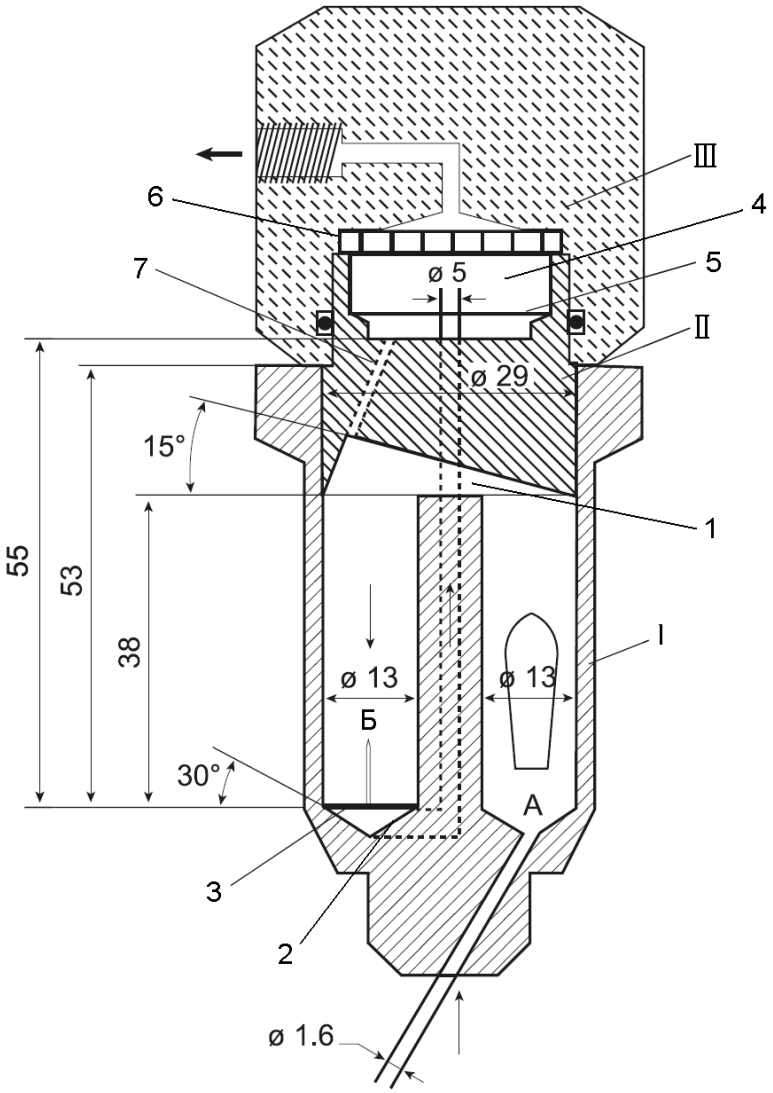


Рис. 2 – Проточная ячейка

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 pH ± 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 ± 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, указанной 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 суппозиториев на липофильной основе

Стадия	**Число испытуемых образцов**	**Одна единица лекарственной формы**
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 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 испытуемых 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

Степень сыпучести порошков	**ОФС.1.4.2.0016.15** **Вводится впервые**

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 лекарственных 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 ±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*.

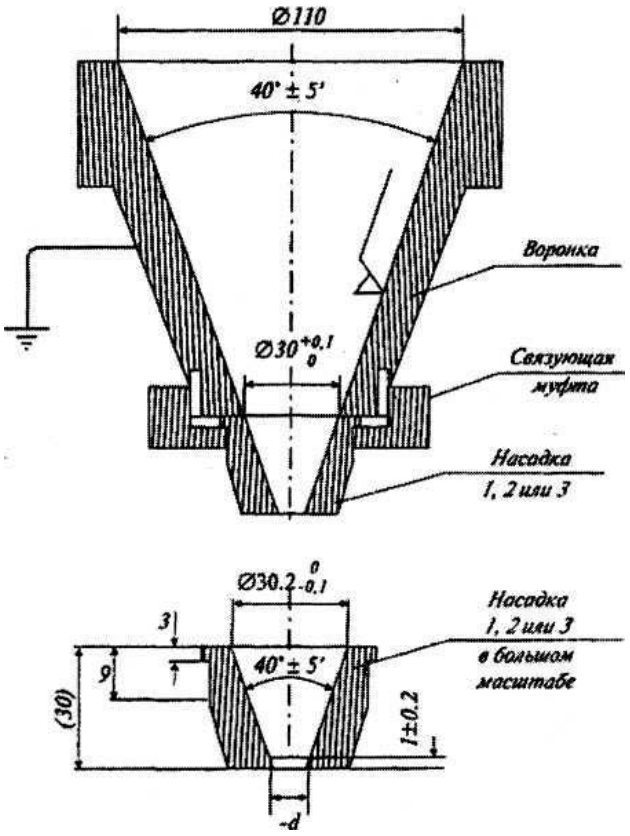


Рис. 1 – Воронка без выходного ствола (бункер) со сменной насадкой
Насадку изготавливают из нержавеющей кислотоупорной стали (V4A, CrNi). Размеры указаны в мм

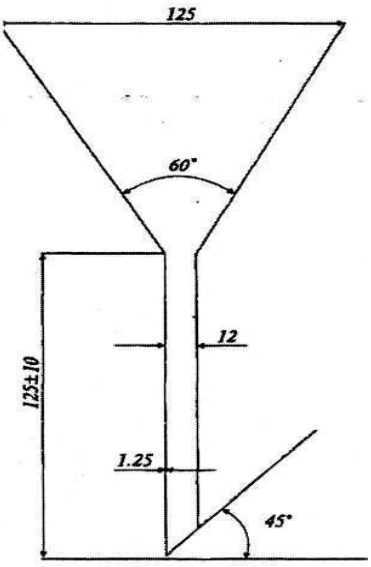


Рис. 2 – Воронка с выходным стволом
Размеры указаны в мм

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 ± 0,01
2	15 ± 0,01
3	25 ± 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 дополнительное перемешивание или вибрация)	46–55
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±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.

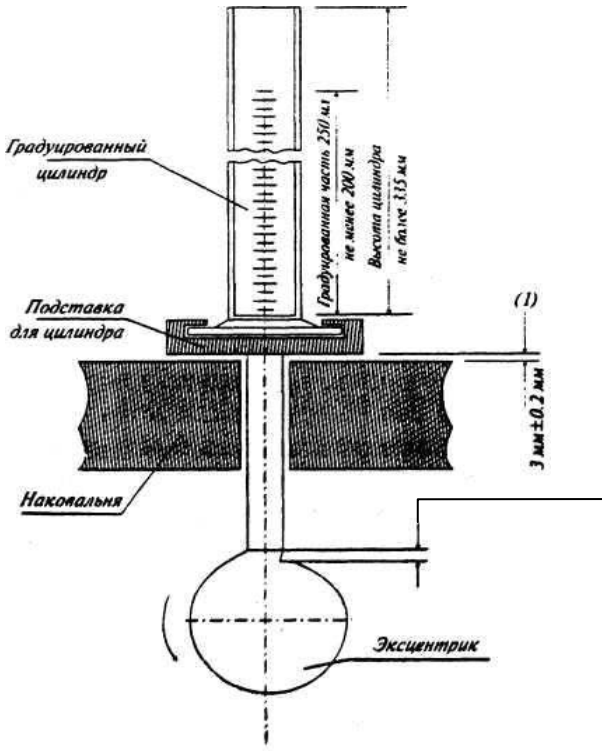


Рис. 3 – Прибор для определения насыпного объема

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.

Растворение для трансдермальных пластырей **ОФС.1.4.2.0017.15**

Вводится впервые

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 мембрану 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 $см^2$.

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).

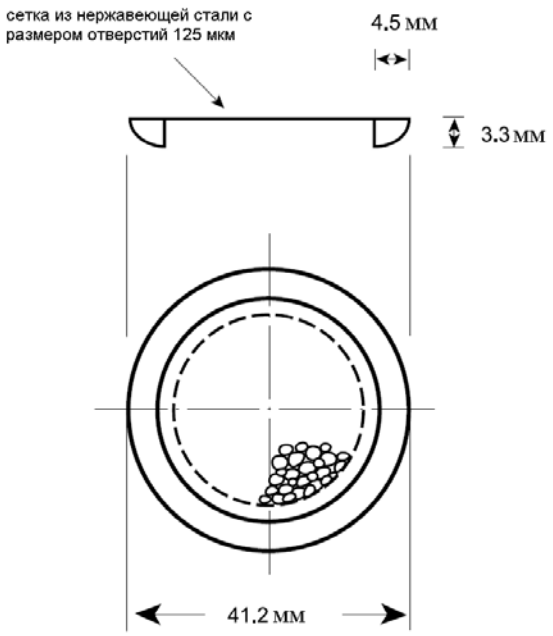


Рис. 2 – Схема сборного диска

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 pH ± 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 ± 0,5) ºС.

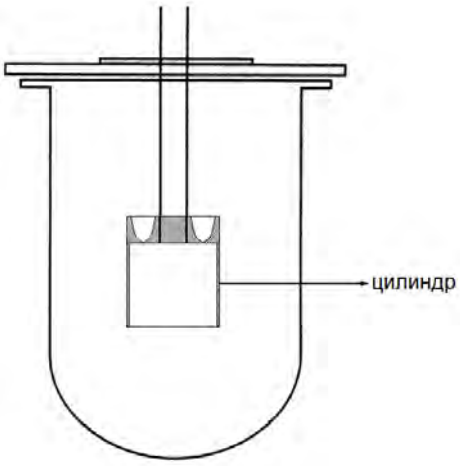


Рис. 3 – Схема прибора 3

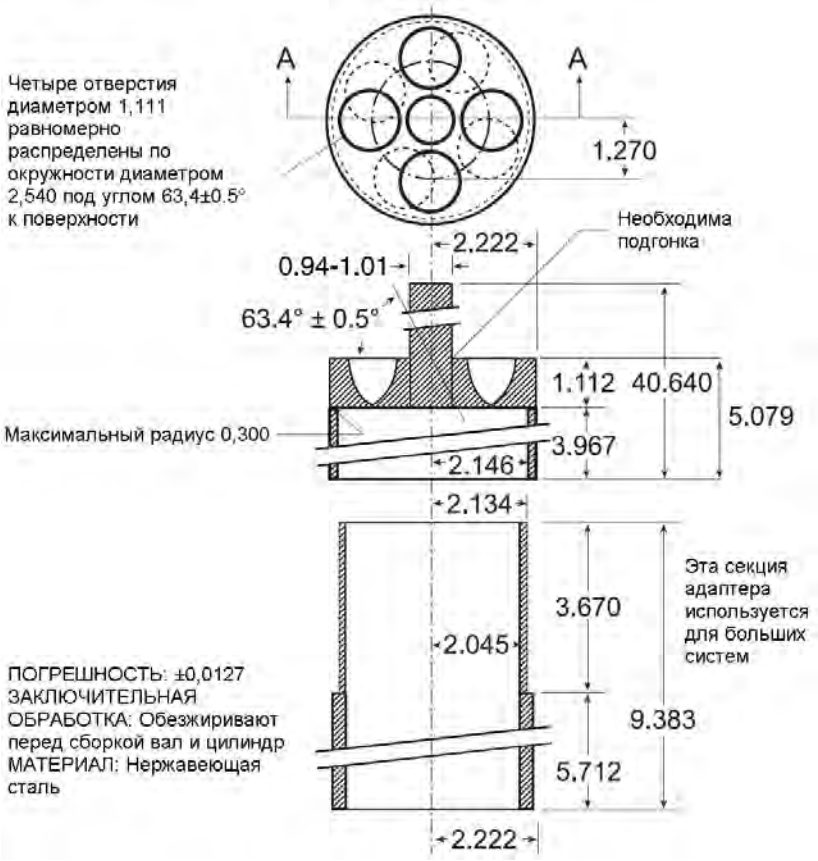


Рис. 4 – Схема вращающегося цилиндра
Размеры указаны в см

Растворенные газы, находящиеся в среде растворения, должны быть удалены до проведения испытания валидированным методом дегазации растворов.

Для предотвращения испарения среды растворения сосуды 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 ± 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±0,5) °С.

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 покровный 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 ±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.

Стадия	Число опытов	Критерии
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. 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 %.

Растворение для резинок жевательных лекарственных **ОФС.1.4.2.0018.18**

Вводится впервые

Испытание предназначено для определения количества действующего вещества, которое за определенный промежуток времени должно высвободиться в среду растворения из жевательной резинки.

Определение проводят путем механического разминания кусочка жевательной резинки, помещенного в небольшую камеру, имитирующую процесс жевания. Условия проведения испытания должны быть указаны в фармакопейной статье и/или нормативной документации,

Оборудование

ПРИБОР А

Прибор А для имитации жевания (рисунок 1) состоит из следующих частей:

- камера, имитирующая процесс жевания;
- вертикальный поршень;
- два горизонтальных поршня с уплотнительными О-образными кольцами и прокладками.

Камера для имитации жевания состоит из четырех отдельных частей:

- центральная камера;
- воронка (рисунок 2);
- два направляющих элемента с втулками (рисунок 3).

Воронку и направляющие элементы монтируют в центральную камеру. Уплотнительные О-образные кольца вставляют в выточку поршня, вокруг которой помещена прокладка, обеспечивающая герметичность камеры.

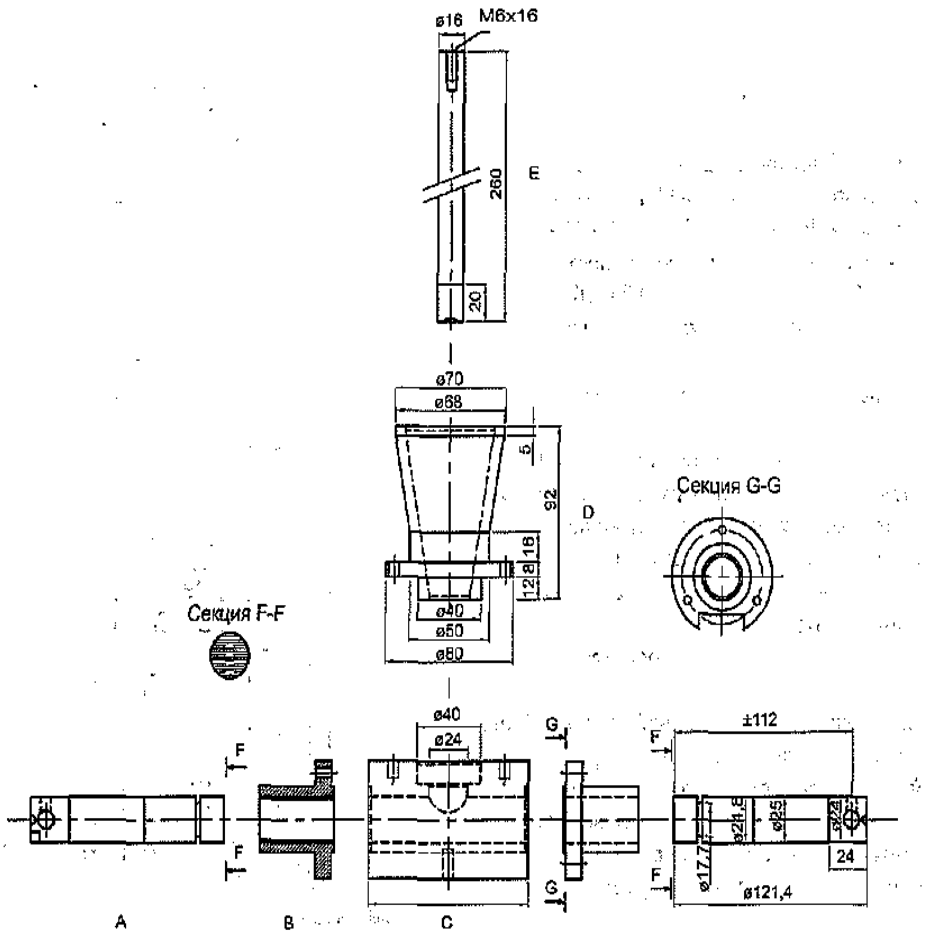


Рисунок 1 – Прибор А для имитации жевания.
Жевательная камера и поршни.
Размеры указаны в мм
А – горизонтальный поршень; В – направляющая; С – жевательная камера; D – воронка; Е – вертикальный поршень.

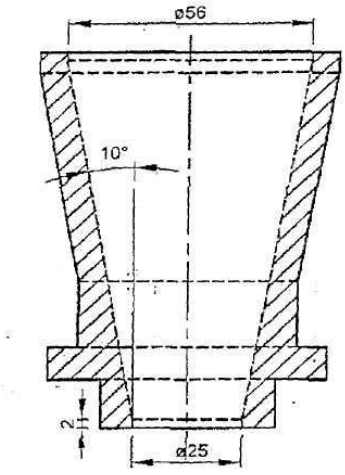


Рисунок 2 – Прибор А. Воронка
Размеры указаны в мм

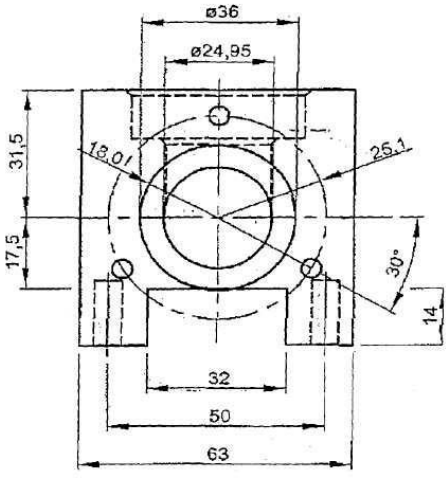


Рисунок 3 – Прибор А. Направляющая
Размеры указаны в мм

Горизонтальные поршни размещаются в камере для имитации жевания через направляющие.

Жевательную резинку подвергают воздействию при помощи горизонтальных поршней; вертикальный поршень обеспечивает правильное местоположение жевательной резинки в процессе имитации жевания.

Для обеспечения постоянства рабочего цикла скорость прибора контролируется. Один цикл жевания определяется следующим образом: горизонтальные поршни начинают свое движение из крайних внешних положений, движутся к самому дальнему внутреннему положению и обратно в крайнее внешнее положение. В течение одного цикла вертикальный поршень движется из самого нижнего положения к самому верхнему и обратно в самое нижнее положение.

Величина хода каждого горизонтального поршня составляет 25,0 мм. Максимальное расстояние между двумя горизонтальными поршнями составляет 50 мм. Минимальное расстояние между двумя горизонтальными поршнями составляет от 0,1 мм до 1,0 мм. Величина хода вертикально поршня составляет 22,0 мм.

Движение горизонтальных поршней контролируется таким образом, чтобы оба поршня находились в самом дальнем внутреннем положении одновременно. Движение вертикального поршня должно согласовываться с движением горизонтальных поршней.

При необходимости прибор может быть сконструирован таким образом, чтобы к концу цикла горизонтальные поршни вращались вокруг собственных осей в противоположном направлении друг к другу для достижения максимального эффекта жевания.

Все части прибора, которые могут находиться в контакте с препаратом или средой растворения, должны быть химически инертными и не должны адсорбировать, реагировать или иным образом взаимодействовать с образцом.

ПРИБОР Б

Прибор Б для имитации жевания (рисунок 4) состоит из:

- ячейки для испытания (рисунок 5 или 6);

- вертикального штока с верхней жевательной поверхностью (рисунок 7);

- камеры-основания с нижней жевательной поверхностью (рисунок 8);

- устройства для выполнения жевательных движений;

- устройства, вращающего вертикальный шток.

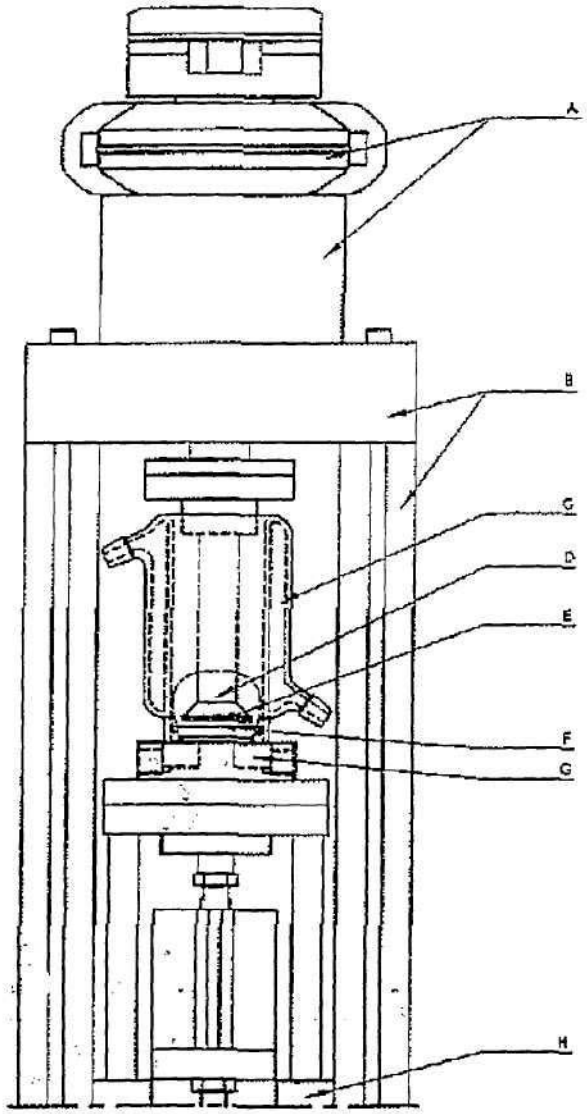


Рисунок 4 – Прибор Б

A – вращающееся устройство для внутренней поверхности имитации жевания; B – корпус; C – ячейка для испытаний; D – шток; E – верхняя поверхность имитации жевания; F – нижняя поверхность имитации жевания;

G – камера-основание; H – устройство для имитации жевания движения с движением вверх-вниз

Обычно резинку вставляют между двумя вращающимися пластиковыми сетками для предотвращения ее распадания.

Допускается использование сеток, изготовленный из нейлона (PA6), с размером ячеек 1,4 мм и диаметром нитей 0,405 мм.

Жевательную резинку подвергают воздействию при помощи нижней и верхней жевательных поверхностей. Скорость прибора контролируют для обеспечения постоянства рабочего цикла. Расстояние между нижней и верхней жевательными поверхностями может устанавливаться до 5 мм. Угол вращения вращательного устройства составляет около 20 °.

Ячейки для испытаний могут также оснащаться одной или двумя стеклянными трубками для отбора проб, имеющими двойные термостатируемые стенки. Трубки позволяют также обеспечить сток жидкости наружу, который может потребоваться для умеренно растворимых веществ.

Все части прибора, которые могут находиться в контакте с препаратом или средой растворения, должны быть химически инертными и не должны адсорбировать, реагировать или взаимодействовать с образцом.

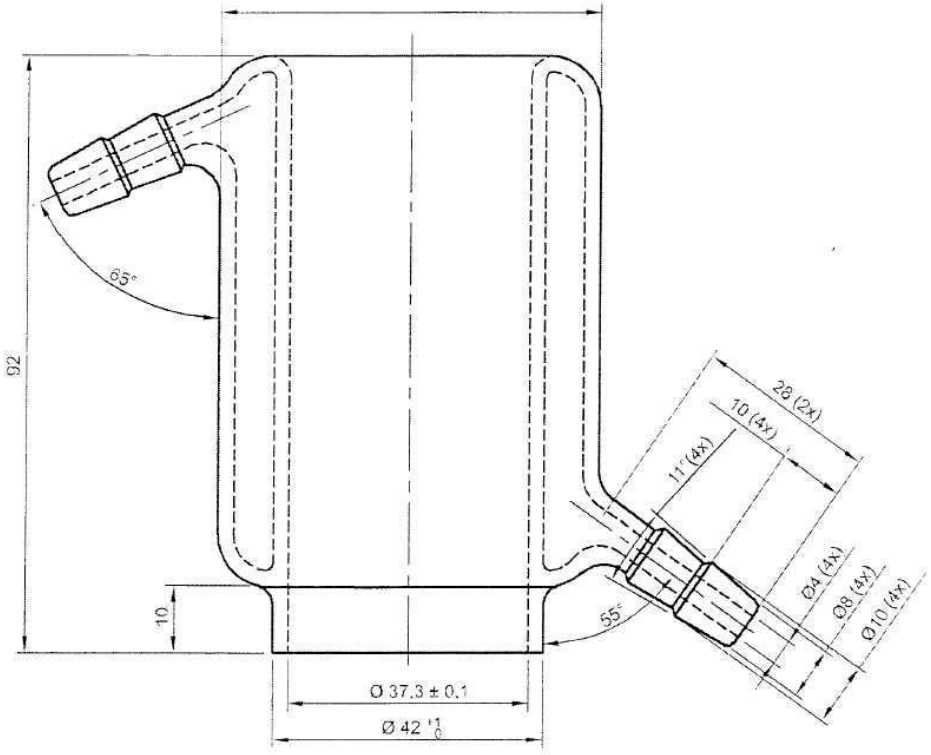


Рисунок 5 – Прибор Б. Ячейка для испытания
Размеры указаны в мм

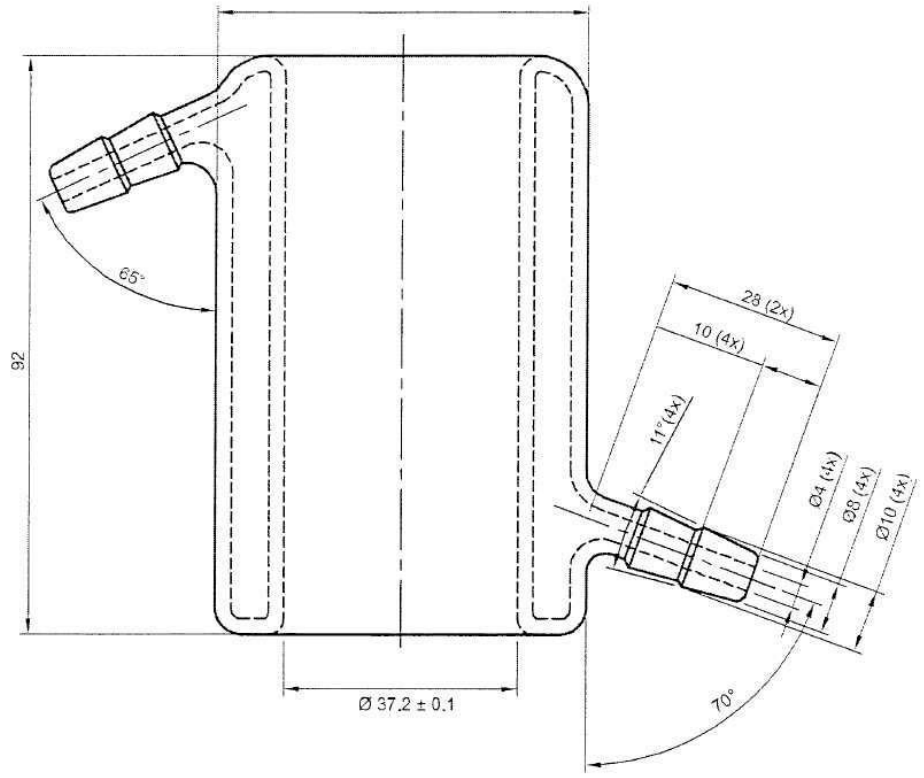


Рисунок 6 – Прибор Б. Ячейка для испытания (прямая)
Размеры указаны в мм

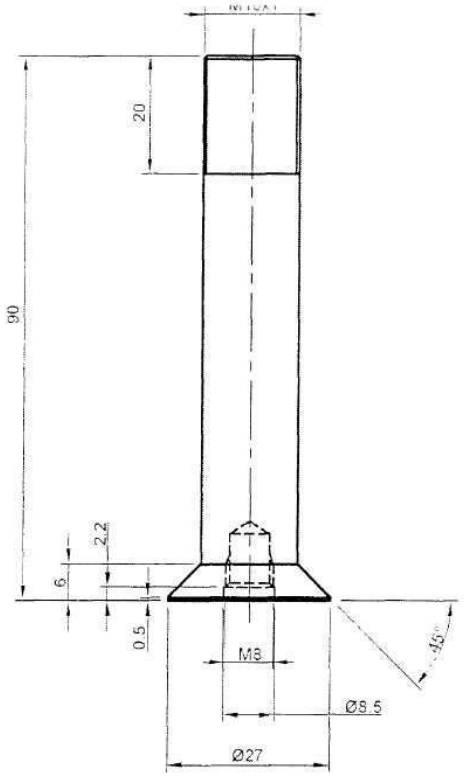


Рисунок 7 – Прибор Б. Шток
Размеры указаны в мм

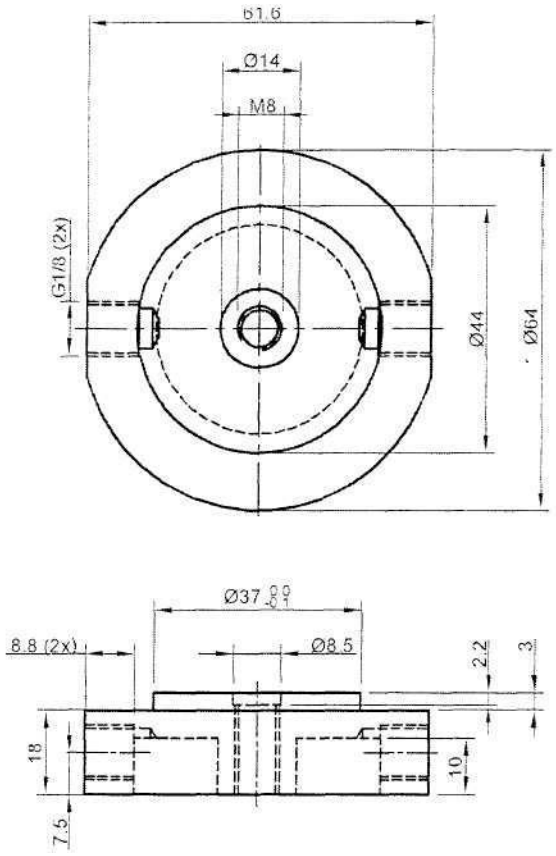


Рисунок 8 – Прибор Б. Камера-основание
Размеры указаны в мм

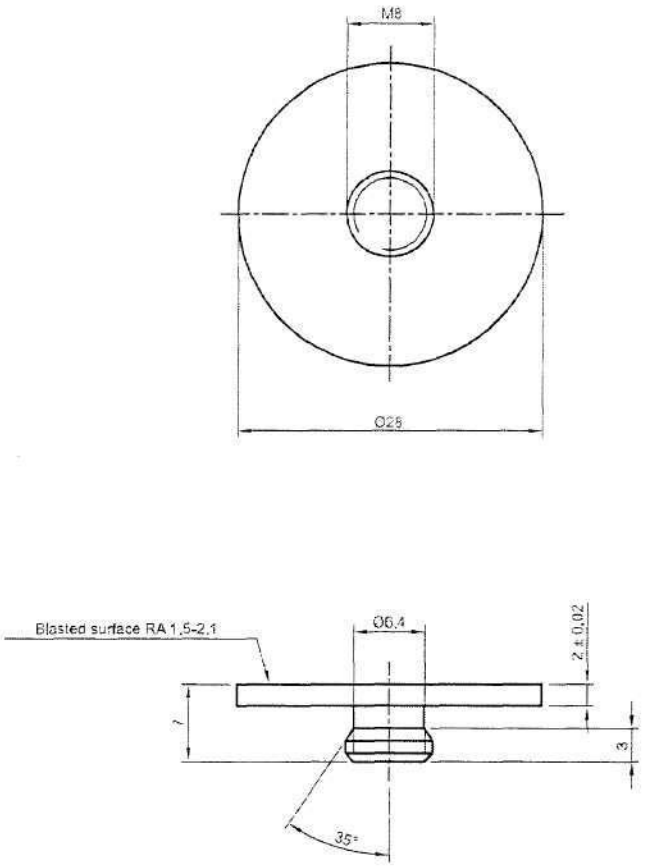


Рисунок 9 – Прибор Б. Верхняя поверхность имитации жевания
Размеры указаны в мм

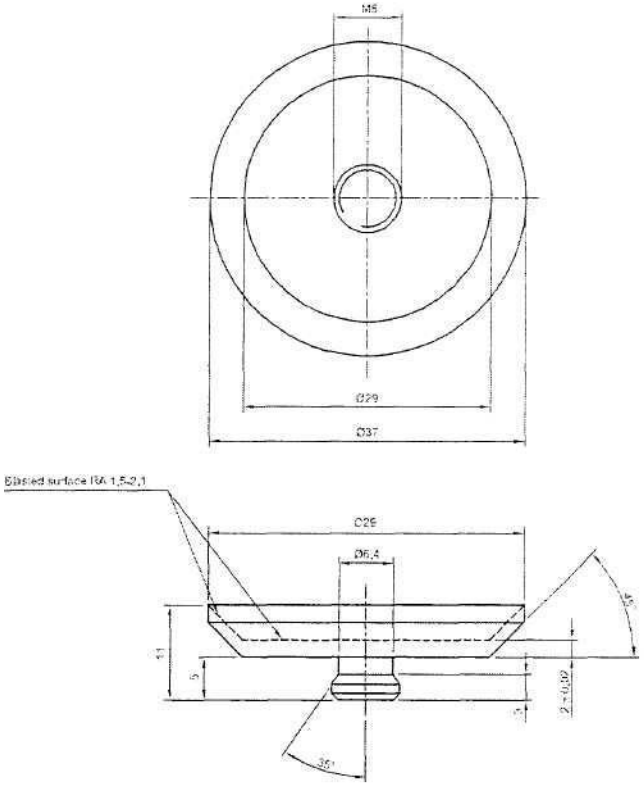


Рисунок 10 – Прибор Б. Нижняя поверхность имитации жевания
Размеры указаны в мм

Методика

В фармакопейной статье или нормативной документации на конкретную жевательную резинку указывается:

- используемый прибор (тип А или тип Б);
- состав, объем и температура среды растворения;
- количество циклов «жевания» в минуту;
- время и метод отбора проб;
- методика количественного определения.

Количественное определение действующего вещества проводят в остатке жевательной резинки или в среде растворения.

В камеру для имитации жевания помещают указанный объем среды растворения, как правило, 20 мл фосфатного буферного раствора с pH 6.0 (2). Поддерживают температуру среды растворения при 37 ± 0,5 ° С, используя электрическое устройство с внешним контролем (прибор А) или термостат (прибор Б). Задают скорость движения поршней при указанном числе циклов жевания в минуту (обычно 60). Точно взвешивают часть жевательной резинки или резинку целиком, помещают ее в камеру для имитации жевания и приводят прибор в действие.

Отбор проб и оценка результатов

Останавливают прибор в указанное время. Удаляют остатки резинки и отбирают пробу среды растворения. Определяют содержание действующего (-их) вещества (веществ) по соответствующей методике. После каждого отбора проб допускается восполнение среды растворения; при расчетах необходимо учитывать изменение объема среды растворения или разбавление пробы. В качестве альтернативы возможно определение содержания действующего вещества (веществ) оставшегося (-ихся) в жевательной резинке. Испытание последовательно проводят на шести жевательных резинках.

Количество действующего(-их) вещества (веществ), растворенного(-ых) за определенное время, выражается в процентах от содержания, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения **ОФС.1.5.1.0001.15**

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, цельное или измельченное в пачках, 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».

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание биологически активных веществ, обусловливающих 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:

$$m = \frac{A \cdot B}{Б}$$

где m – количество лекарственного растительного сырья, необходимое для производства лекарственных растительных препаратов, г;

A – прописанное количество лекарственного растительного сырья, г;

$Б$ – 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.

Травы **ОФС.1.5.1.0002.15**

Herbae

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 глубинных 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 канальцы), 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 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 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

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, обратнояйцевидная, округлообратнояйцевидная, широкообратнояйцевидная, ланцетная, сердцевидная,

стреловидная, копьевидная, серповидная, игольчатая и др.).

3. *Глубину рассечения листовой пластинки* (пальчатолопастные, перистолопастные, тройчатолопастные, пальчатораздельные, перисторазделъные, 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 «давленые» 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, широко-крылатая), 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 канальцы), 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 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 валидированными 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.

Цветки **ОФС.1.5.1.0004.15**

Flores

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* – слизь, 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-четырехгранная, 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) *экзины* (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 канальцы), 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

Корой в фармацевтической практике называют наружную часть стволов, ветвей и корней деревьев и кустарников, расположенную к периферии от камбия. Кору, как правило, заготовляют 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, «давленые» 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 сплющенную 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 давленых 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 одревеснevшие 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.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы **ОФС.1.5.1.0006.15**

Radices, rhizomata, bulbi, tubera, bulbotubera

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, сплющенные и т. п. Клубни шаровидные, овальные, иногда сплющенные, 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, «давленые» 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 – эпиблему или ризодерму* (стенки клеток обычно тонкие, иногда утолщены с внешней стороны, могут подвергаться одревеснению или опробковению).

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, каменистые 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* (сердцевина, 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 сплющенную 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 пояска 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 давленых 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 давленых 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 (эпиблемы, 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 валидированными 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 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

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 различно. 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, тыквина, 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 или вместилищ*.

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 «давленые» 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 давленые 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 одревеснevшие 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.

Семена **ОФС.1.5.1.0008.15**

Semina

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 «давленые» микропрепараты.

В диагностике семян важное значение имеет строение семенной кожуры, которая может состоять из нескольких слоев характерного строения,

включая эпидермис семени (наружный слой кожуры). Для некоторых семян характерно наличие слизи в эпидермальных клетках кожуры, для других – пигментного слоя. Для общей микроскопической картины учитывают величину и форму запасающей 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 кожуры*:

- 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 «давленые» 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 обусловливает 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**

Gemmae

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, кутинизация 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.

Эфирные масла **ОФС.1.5.2.0001.15**

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»; «Перекисное 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.

Масла жирные растительные **ОФС.1.5.2.0002.15**

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, арахиновая 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»; «pH» 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 ºС, 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 метилене, 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».

pH. pH 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 ºС.

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 свежепрокипяченой 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 натрия 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 раздельно 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**

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 Зв : 1000 = 1 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.

Примечание. Испытание по показателю не проводится при наличии протоколов анализа на лекарственное растительное сырье/фармацевтическую субстанцию растительного происхождения тех партий/серий, из которых произведен лекарственный растительный препарат.

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 - ΔA) до (A + ΔA) , в котором с вероятностью P=0,95 находится значение измеряемой величины A (Бк):

$$A - \Delta A < A \leq A + \Delta A, \qquad (1)$$

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; ΔA=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 - ΔA) 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:

$$\text{от 0 до } (A + \Delta A) \text{ или } \{0 - (A + \Delta A)\}. \qquad (2)$$

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения: A=15 Бк; ΔA=20 Бк.

$$15 - 20 < 15 \leq 15 + 20 \ (1) \rightarrow 0 < 15 \leq 35 \qquad (3)$$

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 – ΔA).

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения:

$$A = -5 \text{ Бк}; \ \Delta A = 20 \text{ Бк, т.к. } A < 0 - 5 < 0 \rightarrow 0 - 20. \qquad (4)$$

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».

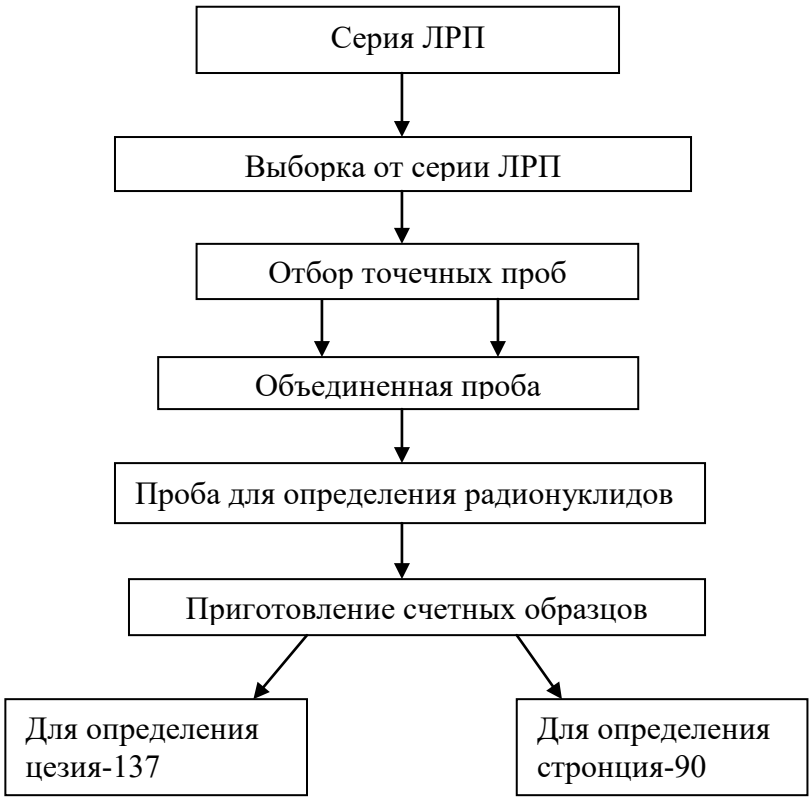
Отбор пробы для радиационного контроля от партии ЛРС и от серии ЛРП имеют разные схемы отбора проб и разный объем выборки.

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	Алтея 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 слоевища	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-13. 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 озоления. 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:

$$M_{np\text{Sr-90}} = \frac{(A_0 \sqrt{H})_{\text{Sr-90}} \cdot \sqrt{t_0/t_{изм}}}{1 - (A_0 \sqrt{m_{пр} \cdot H})_{\text{Cs-137}} \cdot \sqrt{t_0/t_{изм}}} \qquad (5)$$

где H – допустимый уровень удельной активности радионуклида в испытуемом веществе;

$m_{пр}$– 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;

$A_{0\ \text{Sr-90}}$ – минимальная измеряемая активность Sr-90 по алгоритму «с учетом 40К», в данном случае $A_{0\ \text{Sr-90}}$ = 0,6 Бк, а при использовании алгоритма без учета 40 К $A_{0\ \text{Sr-90}}$=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.

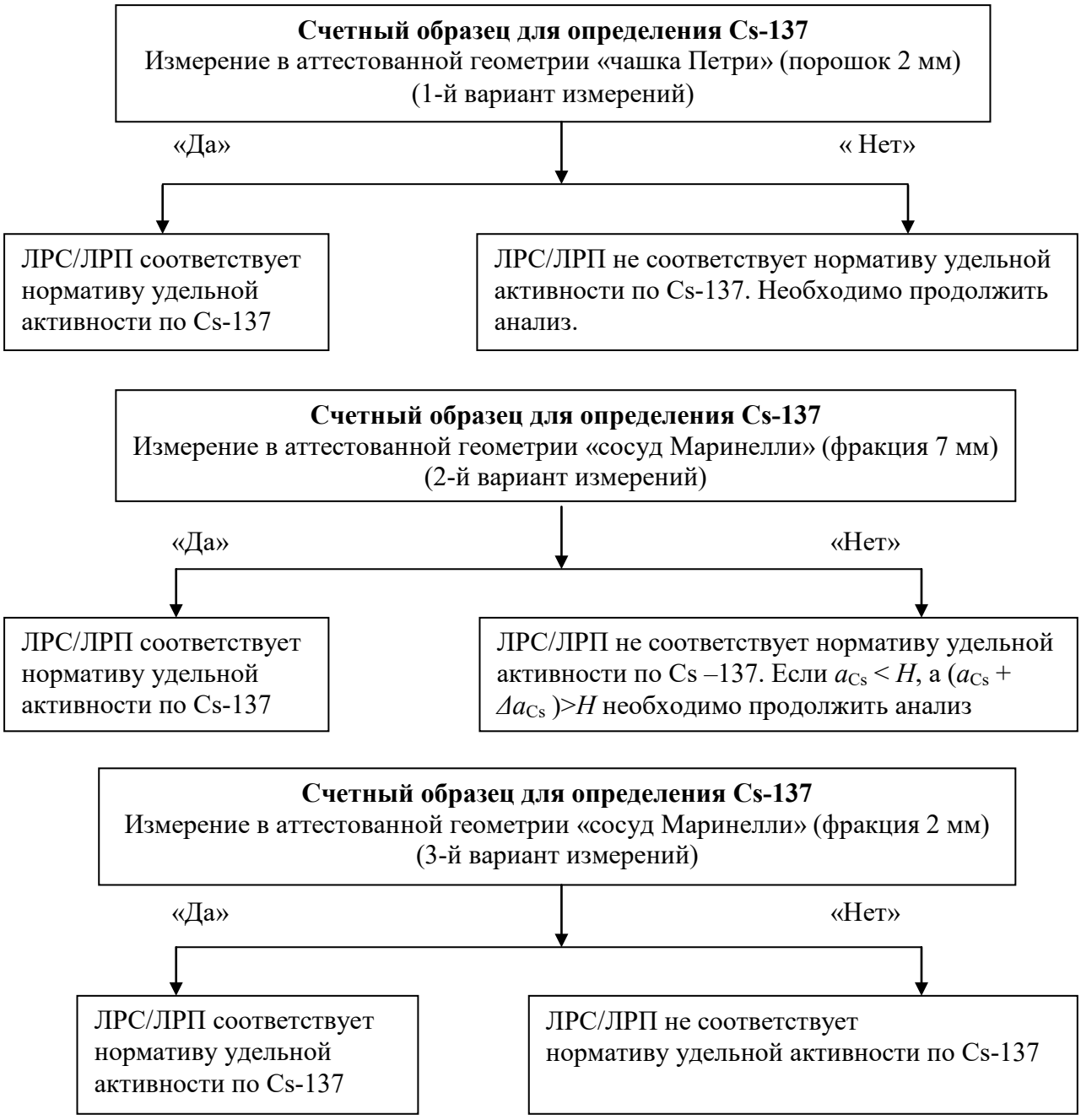


Схема 3 – Схема проведения радиационного контроля на содержание Cs-137

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).

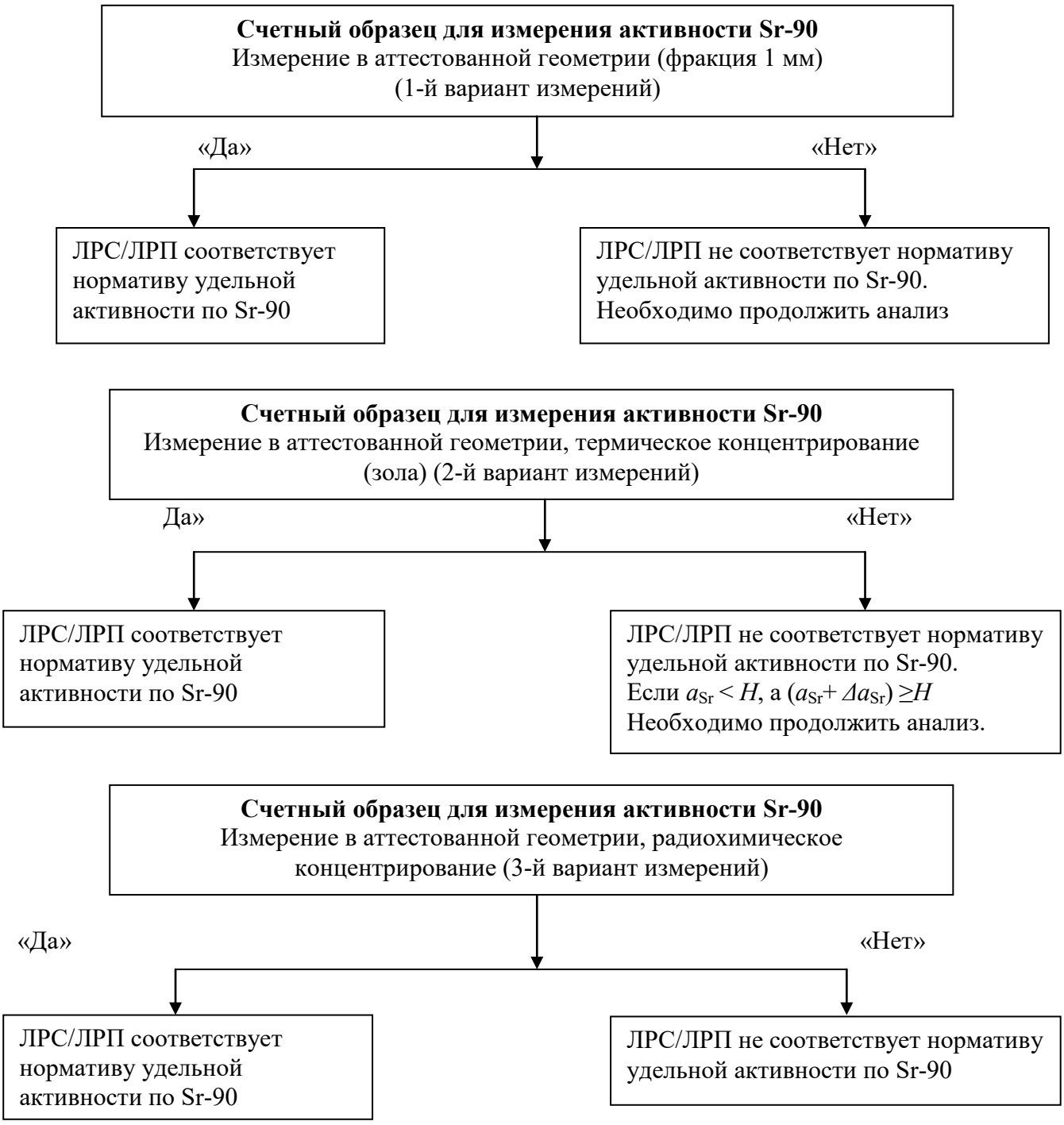


Схема 4 – Схема проведения радиационного контроля на содержание Sr-90

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 условии точности $\Delta B<0,3$.

При измерении «активных проб» используют следующее уравнение:

$$\frac{(A_0)_{Sr\text{-}90}}{(m_{пр}\cdot H)_{Sr\cdot 90}} + \frac{(A_0)_{Cs\text{-}137}}{(m_{пр}\cdot H)_{Cs137}} = 0,3$$

Исходя из него, можно вычислить массу счетного образца по следующему выражению:

$$m_{пр\ Sr\text{-}90} = \frac{1}{0,3 - (A_0/m_{пр}\cdot H)_{Cs\text{-}137}} \cdot \frac{(A_0)_{Sr\text{-}90}}{(H)_{Sr\cdot 90}}$$

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:

$$B = (a/H)_{\mathrm{Sr}} + (a/H)_{Cs} \quad ,$$

$$\Delta B = \sqrt{(\Delta\, a/H)^2_{Sr}} + \sqrt{(\Delta a/H)^2_{Cs}} \quad ,$$

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**

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 (*Tyroglyphus farina* L.), клещ волосатый (*Glyciphagus destructor* Schrank.), клещ хищный (*Cheyletus eruditus* Schrank.),	амбарная моль (*Tinea granella* L.), хлебный точильщик (*Sidotrepa panicea* L.), их личинки и

	сухофруктовый клещ (*Carpoglyphus lactis* 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**

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.

«Давленый» 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 «давленые» 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 люминесцентной 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.

Люминесцентная микроскопия выполняется с помощью люминесцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминесцентными осветителями.

Препараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.

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. Частички 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 поперченного 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 сырье. 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 давленых препаратах и на срезах. Давленые 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 давленых 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 давленые 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 давленые 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, коричневато-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 давленые 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 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 делений окуляр-микрометра = 10 делений объект-микрометра × 10 мкм = 100 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 · 2 мкм = 20 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 эфиро-масличной железки установлено, что он составил 5 делений окуляр-микрометра. Реальный размер эфиро-масличной железки соответствует: 5 · 2 мкм = 10 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 (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. $d = 420$ мкм = 0,42 мм; $r =$ 210 мкм = 0,21 мм;

$r^2 = 0{,}0441$ мм^2; $S = 3{,}1416 \cdot 0{,}0441 = 0{,}138$ 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, обусловливающие 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 пластилином, 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 обусловливают 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.

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

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, луковицы, клубни, клубнелуковицы», «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 ±0,1 г при массе аналитической навески свыше 100 г и ±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 ± 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 ±0,1 г при массе аналитической навески более 100 г и погрешностью ±0,05 г при массе аналитической навески 100 г и менее.

Содержание каждого вида примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2} \qquad (1)$$

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 отсеве, 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 ± 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 ^{o}C до приобретения осадком сыпучести. Высушенный осадок (минеральную примесь) охлаждают и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Содержание минеральной примеси рассчитывают по формуле (1).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте **ОФС.1.5.3.0005.15**

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 разведенной 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**

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 ±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 ± 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, необходимом 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

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 ± 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 ± 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 ±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 ±0,0005 г.

Влажность (W) лекарственного растительного сырья/препарата в процентах вычисляют по формуле:

$$W = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m},$$

где m – масса до высушивания, г;
m_1 – 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.

Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах	**ОФС.1.5.3.0008.18** **Взамен ОФС.1.5.3.0008.15**

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 или (+)-катехин в зависимости от группы дубильных веществ (гидролизуемые или конденсируемые соответственно), если в фармакопейной статье не указан другой стандартный образец.

Арбитражным методом определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах является спектрофотометрический метод.

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 0,02 М раствором калия перманганата 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 0,02 М раствором калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания.

1 мл 0,02 М раствора калия перманганата 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 0,02 М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование водного извлечения, мл;

V_1 – объем 0,02 М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора калия перманганата (в пересчете на танин), г;

a – навеска лекарственного растительного 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 спектрофотометрическим методом

Около 2,0 г (точная навеска), если иное не указано в частной фармакопейной статье, измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл 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 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.

Раствор А. 1,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность раствора А (A_1) на спектрофотометре при длине волны 266 нм (для гидролизуемых дубильных веществ) или 278 нм (для конденсированных дубильных веществ), если иное не указано в фармакопейной статье, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют воду.

Раствор Б. К 5,0 мл фильтрата прибавляют 0,05 г кожного порошка, перемешивают полученную смесь в течение 30 мин и фильтруют через бумажный фильтр диаметром около 125 мм. 1,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность раствора Б (A_2) на спектрофо-

тометре при длине волны 266 нм (для гидролизуемых дубильных веществ) или 278 нм (для конденсированных дубильных веществ), если иное не указано в фармакопейной статье, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют воду.

Раствор СО. 0,1 г (точная навеска) СО пирогаллола (для гидролизуемых дубильных веществ) или (+)-(+)-катехина (для конденсированных дубильных веществ), если иное не указано в фармакопейной статье, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Измеряют оптическую плотность раствора СО (A_3) на спектрофотометре при длине волны 266 нм (для гидролизуемых дубильных веществ) или 278 нм (для конденсированных дубильных веществ), если иное не указано в фармакопейной статье, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на пирогаллол или (+)-катехин в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье или лекарственном растительном препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times a_0 \times 125 \times P}{A_3 \times a \times (100 - W)}$$

где A_1 – оптическая плотность раствора А;

A_2 – оптическая плотность раствора Б;

A_3 – оптическая плотность раствора СО пирогаллола или (+)-катехина;

a - навеска лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, г;

a_o – навеска СО пирогаллола или (+)-катехина, г;

P – содержание основного вещества в СО пирогаллола или (+)-катехина, %;

W – влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %.

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

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 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 спектрометрии

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 переведения 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 аппаратурным 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 °С каждые 30 мин (во избежание воспламенения) до 480 °С, 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)

Мокрую 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	Чувствитель-ность, 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 отрабатываются для конкретных приборов в соответствии

с инструкцией по эксплуатации прибора.

Таблица 3 – Ориентировочные параметры определения тяжелых металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектрометрии (электротермический вариант)

Металл	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Стадия озоления (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 озоления, атомизации; $t_{сек}$, с – время озоления, 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 спектрометрии; атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; рентгенофлуоресцентной спектрометрии 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 или методом стандартных добавок в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления стандартных растворов используют готовые растворы стандартных образцов (ГСО) состава ионов металлов отечественного или зарубежного производства (CRM) с аттестованными значениями концентраций элементов в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %.

Измерения для каждого холостого, калибровочного и испытуемого раствора выполняют не менее 5 раз.

За результат измерений принимают среднее арифметическое 3 параллельных определений одной пробы.

Допускается применять линейную, кусочно-линейную или сглаженную нелинейную аппроксимацию градуировочной функции с коэффициентом корреляции не менее 0,990.

Предельно допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка* не должно превышать значений, приведенных в табл. 4 (если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации).

Таблица 4 – Предельно допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Элемент	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**

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.

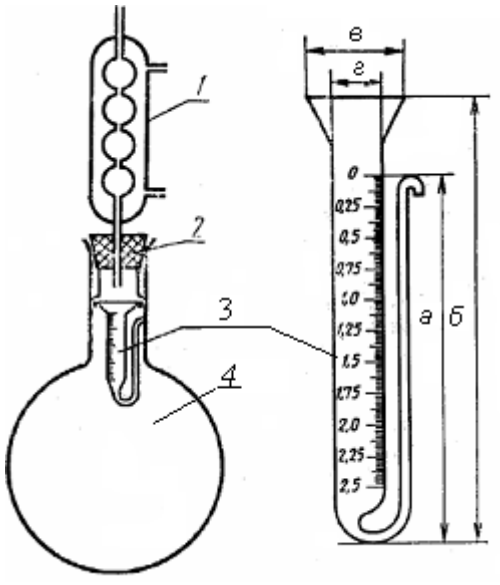


Рис. 1 – Прибор для определения эфирного масла методом 1
1 – обратный шариковый холодильник; *2* – резиновая пробка;
3 – приемник (размеры даны в миллиметрах): *а* – 55-80; *б* – 70-95; *в* – 18-21; *г* – 6-10;
4 – широкогорлая колба

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 прогревания 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.

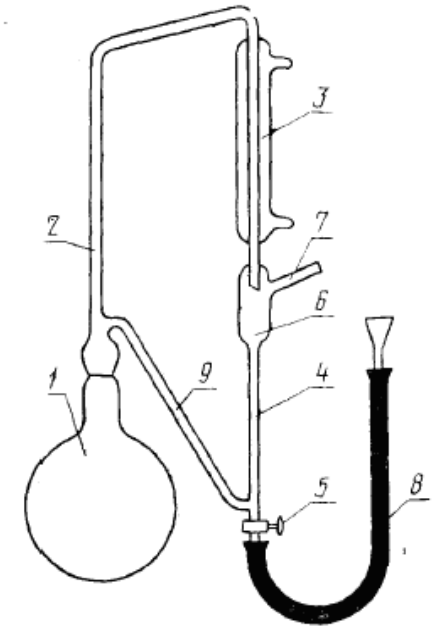


Рис. 2 – Прибор для определения эфирного масла методами 2 и 3
1 – колба; *2* – паропроводная изогнутая трубка; *3* – холодильник;
4 – градуированная трубка-приемник; *5* – спускной кран;
6 – расширение приемника; *7* – боковая трубка приемника;
8 – резиновый шланг; *9* – сливная трубка

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**

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 культивируемом лекарственном растительном сырье и получаемых из него лекарственных растительных препаратах.

Результаты, полученные при определении содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье, распространяются на лекарственный препарат, произведенный из данной партии лекарственного растительного сырья.

Лекарственные растительные препараты подвергаются выборочному контролю на содержание остаточных пестицидов не реже одного раза в год (одна серия каждого наименования).

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 – дихлордифенил-хлорэтилена), гексахлрбензол (ГХБ), алдрина, гептахлора 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.

Примечание. Испытание по показателю не проводится при наличии протоколов анализа на лекарственное растительное сырье/фармацевтическую субстанцию растительного происхождения тех партий/серий, из которых произведен лекарственный растительный препарат».

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 тефлоновую 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 тефлоновую 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 виалу, 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

$T_{нач.}$, °C	v, °C/мин	$T_{конеч.}$, °C	$T_{исп.}$, °C	$T_{инт.}$, °C	V, мкл
70	10	300	280	280	1

Примечание: $T_{нач.}$ – начальная температура термостата колонки (выдержка 4 мин.); v – скорость линейного нагрева колонки; $T_{конеч}$ – конечная температура колонки (выдержка 5 мин.); $T_{исп}$ – температура испарителя; $T_{инт.}$ – 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 β-ГХЦГ γ-ГХЦГ	17,26 17,82 17,96	219, 183, 217, 181	0,848 0,874 0,881
ДДТ ДДД	23,49 22,80	235, 237, 165	1,152 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 ($C_{исп}$) в нг/г или нг/мл вычисляют по формуле:

$$Cисп = \frac{S}{Scm \cdot P(V)} \cdot Ccm - Cконтр,$$

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	Бромофос-метил	0.05
7	Бромофос-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 малаоксоном)	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

N п/п	Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
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	С-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 *цис*-, *транс*- 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	Эндосульфан (изомеры и эндосульфана 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:

$$ПДСОП_{ЛРС} = \frac{ДСП \cdot М}{МСД \cdot 100}$$

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 ($ПДСОП_{ЛРП)}$ рассчитывают по формуле:

1) $Э \leq 10$

$$ПДСОП_{ЛРП} = ПДСОП_{ЛРС} \cdot Э,$$

2) $Э > 10$

$$ПДСОП_{ЛРП} = \frac{ДСП \cdot М \cdot Э}{МСДП \cdot 100}$$

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 и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья **ОФС.1.5.3.0012.15**

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 ($К_{вп}$) рассчитывают по следующей формуле:

$$К_{вп} = \frac{V_1 - V_2}{a} \quad ,$$

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
		Мяты перечной листья	2,4
Горицвета трава	2,8	Подорожника большого листья	2,5
Горца змеиного (змеевика) корневища	2,0	Полыни горькой трава	2,1
Дуба кора	2,0	Пустырника трава	2,0
Душицы трава	2,0	Ромашки аптечной цветки	3,4
Зверобоя трава	1,6	Сенны листья	1,8
Калины кора	2,0	Солодки корни	1,7
Крапивы листья	1,8	Сушеницы трава	2,2
Кровохлебки корневища и корни	1,7	Толокнянки листья	1,4
Крушины кора	1,6	Шалфея листья	3,3
Лапчатки корневища	1,4	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 ($V_{квп}$), необходимый для изготовления водного извлечения с учетом коэффициента водопоглощения ($К_{вп}$), рассчитывают по следующей формуле:

$$V_{квп} = V + m \cdot К_{вп} ,$$

где V – объем водного извлечения, который необходимо получить, мл;
m – масса лекарственного растительного сырья, необходимая для приготовления водного извлечения, г;
$К_{вп}$ – коэффициент водопоглощения данного лекарственного растительного сырья.

Для лекарственного растительного сырья, содержащего слизь, в частности – корней алтея, определяют расходный коэффициент ($К_р$).

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.

Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье	**ОФС.1.5.3.0013.18** **Вводится впервые**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на свежее лекарственное растительное сырье (свежие растения либо их части). Под соком понимают жидкость, полученную из свежего лекарственного растительного сырья путём его механической обработки методом прямого отжима или отжима с предварительной мацерацией.

Содержание сока определяют для лекарственного растительного сырья, используемого для производства/изготовления лекарственных средств, получаемых на основе соков, а также гомеопатических лекарственных средств.

Определение содержания сока проводят гравиметрически одним из описанных ниже способов.

Способ 1 используется для определения содержания выжатого сока в свежем лекарственном растительном сырье, которое в последующем подвергается процессу прессования.

Способ 2 используется для определения содержания выжатого сока в свежем лекарственном растительном сырье, которое в последующем подвергается предварительной мацерации и прессованию.

Способ 3 используется для определения содержания сока, в свежем лекарственном растительном сырье, с влажностью более 60 %, которое в последующем предназначено для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Способ 4 используется для определения содержания сока, в свежем лекарственном растительном сырье с влажностью менее 60 %, которое в последующем предназначено для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

При определении сока в свежем лекарственном растительном сырье пробу, предварительно измельчают до размера частиц не более 10 мм (для способов 1 и 2) или до кашицеобразного состояния (для способов 3 и 4), используя для этого соответствующее оборудование и приспособления (ножницы, мельницы различных типов, ступки и др.), что определяется морфологической группой лекарственного растительного сырья. Измельченную аналитическую пробу свежего лекарственного растительного сырья тщательно перемешивают и берут две навески, взвешенные с погрешностью ± 0,01 г.

Способ 1.

Около 50 г (точная навеска) свежего измельченного лекарственного растительного сырья отжимают во взвешенную колбу вместимостью 50 мл, используя для этого соответствующее оборудование (соковыжималки различных типов, прессы), и взвешивают.

Содержание выжатого сока в свежем лекарственном растительном сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{\text{a}},$$

где m_1 – масса колбы с выжатым соком, г;
m_o – масса пустой колбы, г;
a – навеска свежего лекарственного растительного сырья, г.

Способ 2.

Около 50 г (точная навеска) свежего измельченного лекарственного растительного сырья, помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют равное (по массе) количество воды очищенной (или другого растворителя), перемешивают и настаивают в течение 24 час. После чего фильтруют под

вакуумом через воронку Бюхнера в предварительно взвешенную колбу Бунзена вместимостью 100 мл.

Содержание выжатого сока в свежем лекарственном растительном сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1 - m_0) \cdot 100}{\text{a}},$$

где m_2 – масса колбы с выжатой жидкостью, г;
m_1 – масса прибавленной воды, г;
m_o – масса пустой колбы, г;
a – навеска свежего лекарственного растительного сырья, г.

Для определения содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье, предназначенном для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств, предварительно определяют влажность в соответствии с ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

В зависимости от влажности свежего лекарственного растительного сырья используют способы 3 или 4:

Способ 3 (в свежем лекарственном растительном сырье с влажностью более 60 %).

Около 20 г свежего измельченного сырья отжимают под прессом и полученный сок фильтруют через бумажный складчатый фильтр до получения прозрачного фильтрата. В двух пробах фильтрата по 5 г $\pm$ 0,01 г определяют содержание сухого остатка.

Содержание сока в свежем лекарственном растительном сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$\text{X} = \frac{100 \cdot W}{100 - B},$$

где: *W*- влажность свежего лекарственного растительного сырья, %;
В - содержание сухого остатка в фильтрате, %.

Способ 4 (в свежем лекарственном растительном сырье с влажностью менее 60 %).

К 25 г $\pm$ 0,01 г свежего измельченного лекарственного растительного сырья прибавляют равное (по массе) количество воды очищенной, перемешивают и настаивают в течение 24 час, после чего фильтруют до получения прозрачного фильтрата. Затем в двух пробах по 5 г $\pm$ 0,01 г полученного фильтрата определяют содержание сухого остатка.

Содержание сока в свежем лекарственном растительном сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot (W + B)}{100 - B},$$

где: *W*- влажность свежего лекарственного растительного сырья, %;
B - содержание сухого остатка в фильтрате, %.

Определение сухого остатка в фильтрате

5,0 г (точная навеска) фильтрата помещают в предварительно высушенную при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 5 см или бюкс, выпаривают на водяной бане досуха, сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре (102,5 ± 2,5) °С, охлаждают в эксикаторе (над силикагелем безводным, кальция хлоридом безводным или другим подходящим осушителем) в течение 30 мин и взвешивают.

Для свежего лекарственного растительного сырья, как правило, нормируется нижний и верхний предел содержания сока: не менее … % и не более … %, если не указано иное.

Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов	**ОФС.1.6.1.001.18** **Вводится впервые**

Лекарственное растительное сырье для гомеопатических препаратов – свежие или высушенные растения, либо их части, используемые для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Лекарственное растительное сырье для гомеопатических препаратов включает, цельные растения, надземные, подземные органы растений или их отдельные части, а также водоросли, грибы, спорынью или лишайники, а также определенные выделения (экссудаты) растений, которые не подвергались предварительной специальной обработке.

Требования, предъявляемые к качеству высушенного лекарственного растительного сырья, изложены в ОФС «Лекарственное растительное сырье».

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Лекарственное растительное сырье для гомеопатических препаратов получают от культивируемых или дикорастущих растений, заготавливая его с соблюдением фазы вегетации, сроков и правил его заготовки.

Соответствующие условия культивирования, заготовки, переработки и хранения являются основой для гарантии качества лекарственного растительного сырья, используемого для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Заготовку лекарственного растительного сырья, предназначенного для получения гомеопатических лекарственных препаратов, осуществляют в специально отведенных, экологически чистых местах, в сухую, ясную погоду, таким образом, чтобы оно по возможности было минимально

подвержено загрязнению. При этом лекарственное растительное сырье не должно иметь внешних признаков перенесенных болезней, увядших или отмерших частей растений, значительных повреждений, плесени, насекомых и других загрязнений животного происхождения, присутствие которых недопустимо. Очистка лекарственного растительного сырья, в случае необходимости, должна проводиться с использованием возможно меньшего количества воды. Для дальнейшей переработки остаток воды, по возможности, максимально удаляется.

Химическая деконтаминация лекарственного растительного сырья, используемого в гомеопатической практике, например, с применением этиленоксида, не допустима.

Свежее лекарственное растительное сырье подлежит немедленной переработке. Если немедленная переработка невозможна, лекарственное растительное сырье, предназначенное для транспортирования и хранения, охлаждают, подвергают глубокой заморозке или хранят в спирте 96 % или спирте соответствующей концентрации, при условии, что весь материал, включая средства консервации, используется во время переработки. Сырье, подвергнутое глубокой заморозке, должно быть помещено в замороженном состоянии в спирт предписанной концентрации. При дальнейшей переработке сырья, помещенного в спирт, количество этого спирта учитывается при расчете количества спирта, необходимого для получения настойки гомеопатической матричной в соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

ИСПЫТАНИЯ

Подлинность. Подлинность лекарственного растительного сырья для гомеопатических препаратов устанавливается по органолептическим (цвет, запах), макроскопическим и микроскопическим признакам в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», ОФС «Техника микроскопического и

микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», а также испытанием на присутствие основных групп биологически активных веществ.

Влажность. Определение влажности проводят в соответствии с ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зола общая. Определение золы общей проводят в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая».

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье».

Допустимые примеси. Если свежее лекарственное растительное сырье используется для получения гомеопатических лекарственных препаратов, содержание примесей (сырье, изменившее окраску; другие части растения; недозрелые плоды и др.) должно быть настолько низким, насколько возможно. Испытание на содержание допустимых примесей должно выполняться, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации. Максимальное содержание допустимых примесей указывается в фармакопейной статье или нормативной документации. Содержание допустимых примесей должно быть не более 2 %, если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иначе. Если для гомеопатических препаратов используется высушенное лекарственное растительное сырье, качество его должно соответствовать требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации на лекарственное растительное сырье данного наименования.

Органическая и минеральная примесь. Испытания проводят в

соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные пестициды. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов 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».

Радионуклиды. Определение проводят в соответствие с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание биологически активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие лекарственного растительного сырья, используемого в гомеопатической практике, определяют методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

УПАКОВКА

Согласно требованиям ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Вид упаковки и массу сырья, упакованного в тару, устанавливают для конкретных видов лекарственного растительного сырья и указывают в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, приведены в ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Для свежего

растительного сырья дополнительно указывают дату и часы сбора, предупредительные надписи «Свежее сырье», «Ядовито» (для ядовитых растений).

ХРАНЕНИЕ

Свежее лекарственное растительное сырье должно быть переработано немедленно. Если немедленная переработка невозможна, сырье хранят до переработки от 2 до 24 ч при соблюдении соответствующего температурного режима и консервации, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации

Высушенное лекарственное растительное сырье хранят в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов	**ОФС.1.6.1.002.18** **Вводится впервые**

Сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов включает препараты из целых животных, их частей, а также из желез и выделений желез животных.

Сырье животного происхождения может быть представлено целыми животными (чаще всего, насекомыми), отдельными частями животных, включая железы и выделения из них, а также биологическими жидкостями и выделениями животных.

Сырье животного происхождения в зависимости от вида животных подразделяют на следующие группы:

1. - из ядовитых животных;
   - из неядовитых животных;
   - из животных, употребляемых в пищу.
2. а) позвоночных *(Vertebrata):*
   - млекопитающих *(Mammalia);*
   - змей *(Ophidia);*
   - рыб *(Pisces);*
   - земноводных *(Batrachia);*

   б) моллюсков *(Mollusca);*

   в) насекомых *(Articulata):*
   - пауков *(Arachnida);*
   - кантарис *(Cantharis),* или так называемая шпанская мушка;
   - перепончатокрылых *(Hymenoptera);*

3. - выделения живых животных в определенный период их развития;

- секреты некоторых органов;

- вытяжки из органов здоровых молодых животных;

- вытяжки из патологически измененных тканей животных.

Сырье животного происхождения, используемое для получения гомеопатических лекарственных препаратов, может быть свежим и высушенным.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Сырье животного происхождения должно быть получено от здоровых животных, содержащихся в надлежащих гигиенических условиях. Заготовка сырья, в зависимости от особенностей каждого вида, проводится в соответствии со строгой процедурой, с указанием времени, места забора, при необходимости – условий умерщвления животного, или получения от него продуктов жизнедеятельности, выделений, секретов и т.д.

При переработке живых животных необходимо учитывать нормы закона о защите животных, а именно порядок усыпления животных. Непосредственно перед переработкой низшие животные должны быть помещены в равное количество спирта этилового 94 % (м/м) или умерщвлены в открытом сосуде посредством введения двуокиси углерода, высшие животные должны быть оглушены эфиром или хлороформом.

Все эти особенности должны быть описаны в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

К сырью животного происхождения должны предъявляться требования, сводящие к минимуму риск инфицирования гомеопатических лекарственных средств. При этом:

- методы производства должны включать стадию или стадии, которые удаляют либо инактивируют факторы инфицирования;

- в некоторых случаях животные или их ткани, используемые для получения сырья, должны выдерживать требования компетентного уполномоченного органа и/или нормативно-правовых актов,

регламентирующих требования, предъявляемые к здоровью животных, используемых в практической деятельности человека.

Переработка органов и тканей теплокровных животных производится непосредственно после убоя или умерщвления. В некоторых случаях допускается сбор свежего материала с последующим его замораживанием.

При необходимости производство должно включать стадию фиксации инфекционных материалов перед экстракцией, которую следует максимально точно описать в соответствии с технологическим регламентом, включая полную информацию об исходном сырье, способах его хранения и правилах безопасности при работе с ним.

Экстракты из органов, тканей и клеток получают путем разведения одного или нескольких компонентов в смеси твердых, жидких или растворенных веществ. Селективные растворители отделяются путем кристаллизации, дистилляции или другими методами.

ИСПЫТАНИЯ

Фармакопейная статья или нормативная документация на сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов должна содержать в вводной части подробную информацию об источнике сырья, способе его получения, включая:

– род и подвид животного;

– идентификация источника животного материала (домашнее или дикое животное), используемый орган или его часть;

– время забора или умерщвления животного;

– возможное наличие потенциально токсических веществ;

– данные об отсутствии риска передачи губчатой энцефалопатии (BSE);

– указание метода получения сырья.

Сырье животного происхождения, предназначенное для получения гомеопатических лекарственных средств должно соответствовать

требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации, которая должна содержать следующие показатели качества: «Описание», «Подлинность», «Чистота» (определение токсических и других примесей), «Влажность», «Количественное определение».

Подлинность и содержание активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие сырья животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов, определяют методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации по валидированным методикам.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Упаковка должна обеспечивать стабильность сырья животного происхождения в течение установленного срока годности.

Вид упаковки и массу сырья, упакованного в тару, устанавливают для конкретных видов сырья животного происхождения и указывают в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических препаратов».

ХРАНЕНИЕ

Высушенное сырье хранится по общим правилам в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».

Свежее сырье хранят до переработки от 2 до 24 ч, при соблюдении соответствующего температурного режима и консервации, указанных в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

Сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов **ОФС.1.6.1.003.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов, которое представляют собой природные минералы, металлы и их соли, неметаллы и их соединения, горные породы, ископаемое топливо (нефть, бурый и каменный уголь и др.), золу растений или животных и/или их частей, в том числе продукты их совместного обжига (прокаливания) с другими неорганическими соединениями, а также продукты химических реакций/химического синтеза, используемые для производства / изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов подразделяется по происхождению на группы:

– природные минералы (Аметист, Апатит, Малахит, Графит и др.);

– продукты химической реакции (Фтористый кальций, Аурум йодатум, Ртуть растворимая по Ганеману и др.);

– продукты химического синтеза (Ацетилсалициловая кислота и др.);

– зола растений и животных (Уголь древесный, Растительный уголь, Зола костная*),* а также наружные защитные скелетные образования некоторых беспозвоночных животных (Кораллиум рубрум, Калькарея карбоника и др.);

– продукты совместного обжига (прокаливания) золы растений и животных с неорганическими соединениями (Гепар сульфур и др.);

– металлы и их соли (химически чистые металлы и металлы, полученные путем возгонки, например, Олово металлическое и др.);

– неметаллы и их соединения (Фосфор, Сера и др.);

– горные породы (Гранит, Мрамор и др.);

– ископаемое топливо и продукты его переработки (Петролеум, Петролеум крудум и др.);

– продукты растительного происхождения (Деготь и др.).

Сырье минерального и химического происхождения, предназначенное для получения гомеопатических лекарственных средств может различаться по растворимости в различных растворителях и, прежде всего, в воде.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Минералы и соединения, нерастворимые в воде, используемые как лекарственное сырье для гомеопатических препаратов, предварительно измельчают до размера частиц, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение размера частиц проводят в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ». После чего их используют для получения тритураций в соответствии с требованиями ОФС «Тритурации гомеопатические».

Металлы, используемые в гомеопатии, могут быть получены путем возгонки руды или путем осаждения из соответствующих солей. При необходимости их предварительно измельчают до размера частиц, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Они могут подвергаться дополнительно дистилляции (возгонке) с получением металлического зеркала. Для этого чистый металл помещается в соответствующий аппарат и нагревается под вакуумом до испарения. Параметры температуры и вакуума подбираются в соответствии с используемым металлом. Газообразный металл конденсируется на поверхности охлажденной части дистилляционного аппарата и образует при этом металлическое зеркало. После охлаждения металлическое зеркало механически снимается с поверхности. Полученный порошок используется

для получения тритураций в соответствии с требованиями ОФС «Тритурации гомеопатические», используемых для получения лекарственных препаратов для наружного применения.

Неметаллы и их соединения (в том числе фосфор, сера, селен, углерод и др.) обрабатываются по методу, приведенному в фармакопейной статье или нормативной документации.

Некоторые растения или животные, а также их части (в том числе наружные защитные скелетные образования ряда беспозвоночных животных) для получении из них гомеопатических фармацевтических субстанций могут подвергаться под воздействием температур минерализации. Различают три вида воздействия температур:

1. от 170 до 250 °С - степень обжаривания (tosta);

2. от 200 до 600 °С - степень обугливания (carbo);

3. выше 500 °С - степень озоления (cinis).

Выбор температурного режима зависит от исходного сырья и необходимой степени минерализации.

Кроме минерализации, это сырье под воздействием очень высоких температур (порядка 1100-1500 °С) также может подвергаться прокаливанию. Полученную субстанцию применяют в соответствии с фармакопейной статьей или нормативной документацией.

В случае, если минеральные соединения извлекаются из сырья животного или растительного происхождения, метод их получения должен быть приведен в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворимые субстанции минерального происхождения используются в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», а также фармакопейными статьями или нормативной документацией. Отдельные способы получения гомеопатических субстанций из сырья минерального и химического происхождения отмечают в фармакопейной статье или нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Фармакопейная статья или нормативная документация на гомеопатическое сырье и субстанцию минерального и химического происхождения должна содержать следующие показатели качества: источник получения (природное или синтетическое), описание, химическая формула (если применимо), молекулярная масса (если применимо), подлинность, испытание на чистоту или допустимые примеси (если применимо), количественное определение (если применимо), метод получения гомеопатической субстанции, хранение.

В случае использования сырья минерального и химического происхождения в аллопатической практике, качество сырья минерального и химического происхождения для гомеопатических препаратов также должно соответствовать требованиям к качеству утвержденных фармакопейных статей и нормативной документации на соответствующие аллопатические субстанции.

Для минералов в разделе «Описание», информация по «Степени твердости по Моосу» имеет информативный характер.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность сырья минерального и химического происхождения в течение установленного срока годности. Вид упаковки указывают в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических препаратов». На этикетке указывают наименование минерального сырья на латинском языке (название минерала, металла или химического соединения).

Для металлов, полученных путем возгонки дополнительно указывают «praeparatum» или сокращенно «praep.».

Для сырья, полученного путем воздействия температур, указывают на латинском языке полученный продукт (Carbo или Cinis), дополнительно

указывают название растения или животного (из которого данный продукт получен) на латинском языке (например, Carbo Betulae, Carbo Ossium и т.д.). Если сырье подвергалось обжариванию, дополнительно указывают «tosta» или «tostum».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 °С.

Особые условия хранения указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов **ОФС.1.6.2.001.18**

Вводится впервые

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственные формы, используемые в производстве и/или изготовлении гомеопатических лекарственных препаратов.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Гомеопатическая фармацевтическая субстанция – лекарственное средство в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, растительного, минерального, химического, синтетического происхождения, а также водные, водно-спиртовые и масляные извлечения из сырья растительного, минерального, животного происхождения, предназначенные для производства и/или изготовления гомеопатических лекарственных средств. В качестве гомеопатических фармацевтических субстанций могут также использоваться настойки гомеопатические матричные, настои и отвары.

Активный компонент – соответствующая гомеопатическая потенция (разведение или тритурация) гомеопатической фармацевтической субстанции.

Гомеопатическое лекарственное средство – гомеопатическая фармацевтическая субстанция или гомеопатический лекарственный препарат, произведенный и/или изготовленный из одной или нескольких гомеопатических фармацевтических субстанций в соответствии с требованиями фармакопеи.

Гомеопатический лекарственный препарат – гомеопатическое лекарственное средство, произведенное и/или изготовленное в одной из принятых в гомеопатии лекарственных форм. Входит в группу

лекарственных препаратов традиционной медицины и может содержать одну или несколько активных субстанций.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ПЕРЕЧЕНЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Лекарственные формы, используемые для получения гомеопатических лекарственных препаратов, в большинстве своем по номенклатуре соответствуют лекарственным формам, используемым в общей практике: растворы, таблетки, мази, суппозитории, пластыри, мази, капли, настойки и др.

Ряд гомеопатических лекарственных форм имеет особенности и по своей технологии получения являются специфичными и применяемыми только в гомеопатии. К таким лекарственным формам следует отнести: гранулы гомеопатические, оподельдоки гомеопатические, разведения гомеопатические и смеси гомеопатические, настои и отвары гомеопатические и др.

Такие лекарственные формы как настойки гомеопатические матричные, тритурации и разведения гомеопатические используются в качестве промежуточных лекарственных форм при получении гомеопатических лекарственных препаратов.

К настойкам гомеопатическим матричным, наряду со спиртовыми настойками, относятся настойки гомеопатические матричные на глицерине и настойки гомеопатические матричные ферментированные.

Технология получения и требования к оценке качества гомеопатических лекарственных форм приведены в соответствующих ОФС: «Гранулы гомеопатические», «Мази гомеопатические», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Тритурации гомеопатические», «Смеси гомеопатические», «Настойки гомеопатические матричные», «Капли гомеопатические», «Капли глазные гомеопатические», «Пластыри гомеопатические», «Растворы для инъекций гомеопатические», «Сиропы гомеопатические», «Суппозитории гомеопатические», «Таблетки гомеопатические», «Настои и отвары гомеопатические».

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Разведения и тритурации получают из гомеопатической фармацевтической субстанции при помощи процесса потенцирования в соответствии с гомеопатической производственной практикой.

Различают способы потенцирования по Ганеману, Корсакову и LM-метод (ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические»).

Обычно используют следующие степени потенцирования:

- 1 часть активного компонента плюс 9 частей растворителя; обозначают как «D» (десятичное разведение);

- 1 часть активного компонента плюс 99 частей растворителя; обозначают как «C» (сотенное разведение).

Число степеней потенций определяет меру разведения, например,«D3», обозначает третью десятичную потенцию, а «C3», третью сотенную потенцию.

«LM-» (или «Q-») потенцию готовят в соответствии со специфическими процедурами (пятидесятитысячное разведение 1/50 000 с самой высокой степенью потенцирования LM30).

Различают следующие степени разведения (потенции):

- D со степенью разведения 1:10 на шаг потенцирования (десятичное разведение);

- C со степенью разведения 1:100 на шаг потенцирования (сотенное разведение);

- M со степенью разведения 1:1000 на шаг потенцирования (тысячное разведение);

- LM со степенью разведения 1:50000 на шаг потенцирования (пятидесятитысячное разведение);

Обычно используют следующие разведения:

- D2, D3, D6 (C3), D12, (C6);

- C12, C13, C30, C50, C100, C200, C500, C1000, C10000;

- M1, M5, M10, CM1;

- LM1, LM2, LM5 и до LM30.

Разведения разделяют на:

- низкие (от настойки до шестого сотенного разведения);

- средние (от шестого до двенадцатого сотенного разведения);

- высокие (выше двенадцатого сотенного разведения);

- сверхвысокие (от сотенного до тысячного разведения и выше)

Особенности потенцирования растворов и получения жидких разведений гомеопатических приведены в ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические».

Аналогичным образом потенцируют твердые фармацевтические субстанции с подходящим вспомогательным веществом – путем получения соответствующей тритурации. Тритурации производят и/или изготавливают в соответствии с требованиями ОФС «Тритурации гомеопатические».

Как правило, при получении гомеопатических лекарственных препаратов в различных лекарственных формах в их состав не включают стабилизаторы и антиоксиданты.

Гомеопатические лекарственные препараты, содержащие в составе ядовитые и сильнодействующие компоненты, отпускают только начиная с разведения D4 и выше.

В случае нетоксичных субстанций растительного происхождения допускается использование настоек гомеопатических матричных.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Оценку качества гомеопатических лекарственных препаратов в лекарственных формах, соответствующих лекарственным формам, используемым в общей практике, как правило, проводят по показателям качества этой лекарственной формы. Для оценки качества гомеопатических лекарственных форм и проведения испытаний используют методы и методики, приведенные в соответствующих ОФС на гомеопатические

лекарственные формы и методы их анализа, а также руководствуются требованиями настоящей ОФС и ОФС «Лекарственные формы».

К показателям, которые являются обязательными для оценки качества гомеопатического лекарственного препарата в любой лекарственной форме, относятся «Описание», «Микробиологическая чистота» (для нестерильных лекарственных форм) и «Стерильность» (для стерильных лекарственных форм), а также показатели «Масса (объем) содержимого упаковки», «Извлекаемый объем» (для жидких лекарственных форм для приема внутрь в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем» и лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»).

Оценку качества гомеопатического лекарственного препарата, связанную с активным компонентом/активными компонентами, проводят по общепринятым показателям – «Подлинность» и «Количественное определение».

В том случае, если степень разведения активного компонента не позволяет определить подлинность или количественное содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

Количественную оценку активного компонента/активных компонентов, как правило, проводят для лекарственных препаратов, которые содержат активный компонент/активные компоненты в разведении до D4.

Подлинность, как правило, определяют в том случае, если разведение активного компонента/активных компонентов не превышает D7.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, приведены в ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Помимо общих требований, предусмотренных ОФС, дополнительно указывают: состав лекарственного препарата, в котором наименование активного компонента/активных компонентов приводят на латинском языке, с указанием шкалы и степени разведений. Название вспомогательных веществ указывают на русском языке.

Гранулы гомеопатические	**ОФС.1.6.2.002.18**
	Взамен ОФС 42-0023-04

Гранулы гомеопатические – твердая лекарственная форма для приема внутрь в виде сфер одинакового диаметра, содержащая активный компонент/ активные компоненты в гомеопатических разведениях.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Гранулы гомеопатические производят/изготавливают путем насыщения или нанесения жидкого гомеопатического разведения одного или нескольких активных компонентов на вспомогательный компонент – ядра гранул, получаемые из сахарозы, лактозы или других подходящих вспомогательных веществ.

Для обеспечения равномерного распределения жидких гомеопатических разведений ядра гранул должны быть одинакового размера. Размеры ядер гранул различают по номерам от 1 до 14 в зависимости от их диаметра или другим параметрам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации, которые соответствуют определенному диаметру ядер гранул. Ядра гранул классифицируют по их количеству в 1 г. Количество ядер гранул подсчитывают в двух параллельных пробах в навеске, взвешенной с точностью до 0,01 г (табл. 1).

Таблица 1 - Характеристика вспомогательного компонента - гранул*

№ гранул	Количество гранул в 1 г	Навеска гранул для подсчета их количества, граммы	Средний диаметр гранул, мм
1	1532-1693	0,02	0,85
2	470-530	0,1	1,4
3	220-280	0,2	1,7
4	110-130	0,4	2,2
5	70-90	0,6	2,5
6	40-50	1	3,0
7	30-40	1	3,3
8	28-32	1,6	3,4
9	22-28	2	3,7
10	16-20	2,5	4,1
11	10	5	5,0
12	5	10	6,3
13	3	15	7,4
14	2	25	8,5

*Плотность от 1,52 до 1,59 г/см^3.

Гранулы гомеопатические получают, как правило, следующими способами.

Способ 1. Насыщение ядер гранул жидким гомеопатическим разведением или смесью гомеопатических разведений.

Способ основан на абсорбции активного компонента ядрами гранул. Ядра гранул насыщают соответствующими жидкими гомеопатическими разведениями, приготовленными на спирте 62 % (м/и) или 70 % (о/о). При этом содержание спирта в разведении должно быть не менее 60 % (м/м), что соответствует 68 % (о/о).

Если концентрация спирта ниже требуемой, производство/изготовление десятичного или сотенного разведения, предназначенного для насыщения ядер гранул, осуществляют с использованием спирта 62 % (м/м) или 70 % (о/о).

Для равномерного распределения разведения ядра гранул предварительно смачивают спиртом 62 % (м/м) или 70 % (о/о), который прибавляют из расчета 1 г на 100 г ядер гранул.

Насыщение ядер гранул жидкими гомеопатическими разведениями производят методом перемешивания в механических смесителях или вручную (для массы до 1 кг) в стеклянных плотно закрывающихся сосудах. Рабочий объем смесителя должен быть в 1,5 – 2 раза больше загружаемой массы ядер гранул. Процесс перемешивания в механических смесителях производят в течение 3 – 4 мин, при ручном способе – в течение 10 мин.

Влажные гранулы высушивают на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы (в соответствии с технологическим регламентом).

На гранулы, полученные данным способом, нельзя насыщать гомеопатическими разведениями ниже С3 (третьего сотенного разведения), полученными из летучих и пахучих веществ, а также из всех кислот.

Способ 2. Наслаивание на ядра гранул гомеопатического/их разведения/ий в сахарном сиропе.

Способ 2 используют для нанесения гомеопатических разведений водных (А), тритураций (Б), смесей (В) с низкими десятичными разведениями и в случаях, когда способ 1 с применением спирта нежелателен.

А. Наслаивание гомеопатических разведений водных.

Для получения 100 г гранул гомеопатических 1 г гомеопатического разведения водного встряхивают с 9 г сахарного сиропа и полученные 10 г смеси равномерно наслаивают на (100 - Х) г ядер гранул, где Х – количество сахара в сахарном сиропе, в граммах.

Б. Наслаивание тритураций.

Для получения 100 г гранул гомеопатических 10 г тритурации встряхивают с 20 г сахарного сиропа, полученную смесь равномерно

наслаивают на (100 - Х - У) г ядер гранул, где Х – количество сахара в сахарном сиропе, в граммах; У – количество вспомогательного вещества, содержащееся в тритурации, в граммах.

В. Наслаивание смесей.

Смеси готовят в соответствии с ОФС «Смеси гомеопатические» путем совместного встряхивания водных гомеопатических разведений и (или) тритураций в сахарном сиропе.

Для получения 100 г гранул гомеопатических 1 г смеси встряхивают с 9 г сахарного сиропа и 10 г этого разведения равномерно наслаивают на (100 – Х - У) г ядер гранул, где Х – количество сахара в сахарном сиропе, в граммах; У – количество вспомогательного вещества, содержащееся в тритурациях, в граммах.

Наслаивание гомеопатических разведений активных компонентов в сахарном сиропе на ядра гранул производят в дражировочных котлах с регулируемым подогревом. Ядра гранул помещают в дражировочный котел, предварительно подогретый до 37 – 42 °С, и медленно вращают до тех пор, пока вся масса гранул не нагреется до той же температуры. Гомеопатические разведения активных компонентов в сахарном сиропе вливают в дражировочный котел постепенно, небольшими равными порциями, через равные промежутки времени. По окончании наслаивания нагрев дражировочного котла прекращают, а вращение его продолжают для высушивания гранул до постоянной массы (в соответствии с технологическим регламентом).

Способ 3. Гранулы гомеопатические получают путем распыления насыщенного раствора лактозы на кристаллы лактозы до формирования гранул шаровидной формы требуемого диаметра в постоянном токе теплого воздуха, с последующим распылением 20 % раствора лактозы с добавлением гомеопатических разведений, приготовленных по десятичной (1:10),

сотенной (1:100) или другой шкале разведений. Температура, скорость поступления воздуха, время распыления растворов до получения гранул определенного размера, должны быть указаны в технологическом регламенте.

При этом количество активных компонентов, нанесенных на ядра гранул любым из этих способов, не должно существенно изменять их средний диаметр и другие физико-химические показатели, так как для характеристики гранул гомеопатических используют показатели исходных ядер гранул.

ИСПЫТАНИЯ

Качество гранул гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Гранулы».

По показателю «Распадаемость» гранулы гомеопатические оценивают по следующей методике: 10 гранул помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной, имеющей температуру $(37 \pm 2)\ ^{o}C$. Колбу медленно покачивают 1-2 раза в секунду. Проводят не менее трех определений. Гранулы должны полностью распадаться в течение не более 5 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Помимо общих испытаний, предусмотренных ОФС «Гранулы» гранулы гомеопатические дополнительно контролируют по показателю «Количество гранул в 1 г»:

Испытание по показателю «Количество гранул в 1 г» проводят по следующей методике: в навеске препарата (величина навески для каждого размера гранул приведена в табл. 1), взвешенной с точностью до 0,01 г, подсчитывают количество гранул. Определение проводят в двух параллельных пробах.

Потеря в массе при высушивании гранул гомеопатических не должна превышать 2 %, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Установление подлинности активных компонентов (если применимо), вспомогательных веществ (сахаров) проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации, с помощью качественных реакций или методом ТСХ, по методике, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для гранул в однодозовых упаковках проводят испытание на однородность массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

В том случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность и определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 °С, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Гранулы (пилюли) импрегнированные гомеопатические	**ОФС.1.6.2.003.18** **Вводится впервые**

Гранулы (пилюли) импрегнированные гомеопатические – твердая дозированная лекарственная форма, получаемая из сахарозы, лактозы или других подходящих вспомогательных веществ, пропитанная жидкими гомеопатическими разведениями/препаратами, предназначенная для подъязычного (сублингвального) применения или для приема внутрь.

Имеют достаточную механическую прочность для того, чтобы быть устойчивыми к растрескиванию или разрушению при обращении с ними.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Гранулы (пилюли) импрегнированные гомеопатические получают способом 1, приведенным в ОФС «Гранулы гомеопатические». Их готовят путем импрегнации одного или более жидкого гомеопатического разведения/препарата на сахарные гранулы. Импрегнацию проводят с использованием жидких разведений/препаратов, содержащих этанол в концентрации обычно не менее 68 % об/об (60 % м/м) в пропорции 1 г жидкого разведения/препарата на 100 г гранул. Обычно гранулы импрегнированные гомеопатические легко растворимы в воде.

При производстве, упаковывании, хранении гомеопатических препаратов принимают необходимые меры для обеспечения их микробиологической чистоты.

ИСПЫТАНИЯ

Качество гранул гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Гранулы гомеопатические».

Внешний вид. Белые, почти белые или слегка окрашенные шарики.

Микробиологическая чистота. Гранулы (пилюли) гомеопатические импрегнированные должны соответствовать требованиям к микробиологической чистоте, приведенным в ОФС «Гранулы гомеопатические».

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 °С, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капли глазные гомеопатические **ОФС.1.6.2.004.18**

Взамен ОФС 42-0010-02

Капли глазные гомеопатические – капли глазные, содержащие один или несколько активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Капли глазные гомеопатические производят/изготавливают по массе, в асептических условиях. В качестве растворителей применяют воду очищенную свежеприготовленную, изотонический раствор натрия хлорида или буферные растворы, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации.

Общие требования к условиям производства/изготовления капель глазных гомеопатических должны соответствовать требованиям ОФС «Глазные лекарственные формы».

При производстве/изготовлении капель глазных гомеопатических используют активные компоненты, предварительно потенцируя их и вспомогательные вещества (к числу которых относятся вещества, используемые в качестве изотонирующих агентов и растворителей).

Для изотонирования капель глазных применяют, чаще всего, натрия хлорид, натрия нитрат, натрия сульфат. Кроме изотонирующих, могут быть использованы вещества, поддерживающие оптимальное значение pH, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации. В многодозовые глазные капли добавляют консерванты.

Стерилизацию капель глазных гомеопатических проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерилизация».

Капли глазные гомеопатические могут содержать один или более активных компонентов в виде соответствующих гомеопатических разведений, приготовление и контроль качества которых регламентированы ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические».

Перед добавлением разведений активных компонентов или их смесей в капли глазные гомеопатические два последних десятичных разведения или последнее сотенное разведение потенцируют с применением воды очищенной свежеприготовленной или натрия хлорида раствора 0,9 % или изотонического раствора, состоящего из 0,2 частей натрия гидрокарбоната, 8,8 частей натрия хлорида и 91 части воды очищенной свежеприготовленной или другого растворителя (кроме спирта), указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. При потенцировании разведений активных компонентов, содержащих спирт и предназначенных для изготовления глазных капель, концентрация остаточного спирта в глазных каплях не должна превышать допустимую норму (не более 0,005 г в 1,0 г).

Вспомогательные вещества добавляют в капли глазные гомеопатические после окончательного потенцирования активных компонентов/та.

ИСПЫТАНИЯ

Капли глазные гомеопатические контролируют в соответствии с ОФС «Глазные лекарственные формы», в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки» определяют объем содержимого упаковки.

Капли глазные контролируют по показателю «Спирт этиловый»: остаточное содержание спирта этилового определяют в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах». концентрация остаточного спирта в каплях глазных не должна превышать допустимую норму – не более 0,5 % (не более 0,995 г в 1,0 г).

Содержание действующих веществ, а также другие показатели определяют в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

В том случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Должна обеспечивать стерильность и стабильность капель глазных гомеопатических при транспортировании и хранении в течение установленного срока годности.

Капли глазные гомеопатические, могут быть упакованы как в однодозовую, так и в многодозовую упаковку с контролем первого вскрытия, при этом последняя должна быть оснащена дозирующим устройством.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В сухом защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Капли гомеопатические **ОФС.1.6.2.005.18**

Вводится впервые

Капли гомеопатические – капли, содержащие один или несколько активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

Требования к каплям глазным гомеопатическим приведены в ОФС «Капли глазные гомеопатические».

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Капли гомеопатические готовят по массе. Капли гомеопатические могут содержать один или более активных компонентов. В качестве активных компонентов могут быть использованы: настойки гомеопатические матричные, их гомеопатические разведения, растворы гомеопатические и жидкие разведения гомеопатические и др. Производство/изготовление гомеопатических разведений, а также их смесей регламентированы ОФС «Настойки гомеопатические матричные», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» и др.

Последнее десятичное или сотенное разведение активного компонента потенцируется с применением растворителя, предусмотренного в составе капель гомеопатических.

В качестве растворителей применяют: воду очищенную, глицерин, спирт, жирные и минеральные масла (или другой растворитель, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации).

ИСПЫТАНИЯ

Капли гомеопатические оценивают по показателям: «Описание» (указывают прозрачность, цвет, запах и др.), «Подлинность»(определяют подлинность активного компонента, если применимо, или вспомогательного вещества), «Спирт этиловый» или «Плотность» с указанием допустимого интервала, «Объем содержимого упаковки», «Микробиологическая чистота».

Остаточное содержание спирта этилового определяют в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах».

В растворах первого, второго или третьего десятичного разведения определяют подлинность активного компонента, в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Содержание активных веществ определяют согласно требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации.

В том случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Особые условия хранения указывают в фармакопейной статье или

нормативной документации.

Мази гомеопатические	**ОФС.1.6.2.006.18** **Взамен ВФС 42-3031-98 и** **ВФС 42-3032-98**

Мази гомеопатические – мази, состоящие из основы и равномерно распределенных в ней одного или нескольких активных компонентов в гомеопатических разведениях.

По консистенции и составу основы мази гомеопатические подразделяются на:

- собственно мази гомеопатические;
- оподельдоки гомеопатические.

Мази гомеопатические (собственно мази гомеопатические) – мягкая лекарственная форма, состоящая из основы и равномерно распределенных в ней одного или нескольких активных компонентов в гомеопатических разведениях.

Оподельдок гомеопатический – мыльный линимент, состоящий из основы и смеси активных компонентов в гомеопатических разведениях.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Активные компоненты в мази гомеопатические вводят в виде настоек гомеопатических матричных и их разведений, тритураций гомеопатических, растворов и жидких разведений гомеопатических, субстанций синтетического, минерального и природного происхождения. Качество используемых в составе мазей активных компонентов регламентировано требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Смеси гомеопатические» и др., а также соответствующих фармакопейных статей.

Для получения мазей гомеопатических, как правило, используют основы природного происхождения: гидрофобные – жировые и углеводородные (ланолин, масла растительные, воск пчелиный, спермацет, вазелин, масло вазелиновое, парафин), гидрофильные – гели высокомолекулярных углеводов и белков (трагакант, агар, желатин, крахмал, мед, глицерин) или другие, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации.

Настойки гомеопатические матричные, входящие в состав мазей гомеопатических в концентрации более 5 %, перед смешиванием с основой либо выпаривают (под вакуумом) до половины взятого количества, либо для их инкорпорирования в вазелин к нему добавляют 5-10 % ланолина безводного.

Концентрация активных компонентов в гомеопатических мазях должна быть указана в виде разведений, как принято в гомеопатии.

Оподельдоки, как правило, готовят в соотношении 1:10.

Основу для оподельдоков гомеопатических жидких получают смешиванием спирта мыльного, воды очищенной и спирта 96 % в соотношении по массе 2:1:1.

В качестве активных компонентов в оподельдоках используют настойки гомеопатические матричные в концентрации, как правило, 3, 5 или 10 %, смеси настоек гомеопатических матричных или смеси разведений настоек гомеопатических матричных и другие лекарственные средства. Летучие и пахучие ингредиенты добавляют в последнюю очередь.

Получение мазей гомеопатических, содержащих порошки металлов, проводят путем смешивания 1 части порошка металла с 9 частями мазевой основы. При этом размер 80 % частиц металла должен быть не более 10 мкм, частицы размером 50 мкм и более должны отсутствовать.

В мази гомеопатические, как правило, не вводят стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты. Допускается добавление консервантов только в тех случаях, когда в качестве основы используют гели, содержащие воду, или эмульсии типа масло/вода.

ИСПЫТАНИЯ

Качество мазей гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Мази».

В оподельдоках гомеопатических помимо общих испытаний, предусмотренных ОФС «Мази», дополнительно определяют:

– плотность в соответствии с требованиями ОФС «Плотность»;

– сухой остаток (испытание по показателю «Сухой остаток» проводят по нижеследующей методике).

Около 2,0 г (точная навеска) оподельдока жидкого гомеопатического помещают в предварительно высушенный при температуре 100-105 ºС до постоянной массы точно взвешенный бюкс и выпаривают при нагревании на водяной бане досуха. Бюкс с сухим остатком сушат при температуре 100-105 ºС до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, когда разница в массе между двумя последними взвешиваниями не будет превышать 0,0005 г.

Подлинность и содержание активных веществ, а также другие показатели определяют согласно требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации.

В случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Для упаковки мазей и оподельдоков гомеопатических, как правило, используют металлические тубы с внутренним лаковым покрытием или тубы из полимерных материалов с защитной мембраной и латексным кольцом, а также банки.

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

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Для стерильных мазей и оподельдоков дополнительно указывают срок хранения после первого вскрытия.

Настои и отвары гомеопатические	**ОФС.1.6.2.007.18 Взамен ОФС 42-0001-00**

Настои и отвары гомеопатические – жидкие лекарственные формы, представляющие собой водные извлечения из лекарственного растительного сырья, используемые для получения гомеопатических лекарственных форм.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Настои и отвары гомеопатические изготавливают и/или производят в соответствии с требованиями ОФС «Настои и отвары».

Для получения гомеопатических водных извлечений используют свежее и высушенное лекарственное растительное сырье, разрешенное к применению в гомеопатии и отвечающее требованиям ОФС «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических препаратов» и соответствующих фармакопейных статей.

Перед получением водных извлечений высушенное лекарственное растительное сырье предварительно измельчают в соответствии с требованиями ОФС «Настои и отвары», свежее лекарственное растительное сырье измельчают до получения кашицы, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Настои и отвары из высушенного лекарственного растительного сырья

Настои и отвары из высушенного лекарственного растительного сырья (D1) изготавливают в соответствии с требованиями ОФС «Настои и отвары».

При использовании полученного настоя или отвара для изготовления и/или производства гомеопатических лекарственных форм, настой или отвар соответствует первому десятичному разведению (D1). Разведения из них го-

товят на воде. Второе десятичное разведение (D2) изготавливают из одной части настоя или отвара и 9 частей воды. Последующие разведения получают из одной части предыдущего разведения и 9 частей воды.

Настои и отвары из свежего лекарственного растительного сырья

Технология и состав извлечений из свежего лекарственного растительного сырья зависит от содержания в нем влаги. Определение влажности лекарственного растительного сырья проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Технология получения настоев

Измельченное лекарственное растительное сырье тщательно перемешивают с рассчитанным количеством воды, нагревают до 37 °С и настаивают (при той же температуре) в течение 1 ч при частом помешивании. По истечении указанного времени настой фильтруют (мягко отжимая растительное сырье) через стерильную ткань.

Технология получения отваров

Измельченное лекарственное растительное сырье заливают рассчитанным количеством воды, предварительно нагретой до кипения, и настаивают в емкости, снабженной обратным холодильником, на кипящей водяной бане в течение 30 мин. По истечении указанного времени отвар фильтруют (мягко отжимая растительное сырье) через стерильную ткань.

Первое десятичное разведение (D1) настоев из свежего лекарственного растительного сырья получают из 4 частей настоя и 6 частей воды.

Первое десятичное разведение (D1) отваров из свежего лекарственного растительного сырья получают из 3 частей отвара и 7 частей воды.

Второе десятичное разведение (D2) получают из 1 части первого десятичного разведения настоя или отвара и 9 частей воды. Последующие разведения получают из 1 части предыдущего разведения и 9 частей воды.

Разведения из настоев и отваров гомеопатических готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические».

В гомеопатические водные извлечения и их разведения консерванты, как правило, не добавляют.

Соотношение лекарственного растительного сырья и объема получаемого водного извлечения берут как для высушенного лекарственного растительного сырья.

Количество воды в кг (X), необходимое для получения водных извлечений, вычисляют по формуле 1 или 2:

1. Для настоев

$$X = \frac{m \cdot (400 - W)}{100},$$

2. Для отваров

$$X = \frac{m \cdot (300 - W)}{100},$$

где m – масса лекарственного растительного сырья, кг;

W – влажность лекарственного растительного сырья, %.

ИСПЫТАНИЯ

Качество настоев и отваров гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Настои и отвары».

УПАКОВКА

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

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, приведены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических препаратов».

Настои и их разведения обозначают «Infusum», отвары и их разведения – «Decoctum». На этикетках также указывают наименование лекарственного растительного сырья, степень разведения настоя или отвара, дату изготовления/производства и предупредительные надписи «Перед употреблением взбалтывать», «Хранить в прохладном месте».

ХРАНЕНИЕ

Настои и отвары гомеопатические, а также их разведения, как правило, используют свежеприготовленные.

При необходимости, настои и отвары гомеопатические хранят при температуре от 2 до 8 °С, в защищенном от света месте, от 2 – 3 ч до 2 сут, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Настойки гомеопатические матричные	**ОФС.1.6.2.008.18** **Вводится взамен ОФС 42-0027-05 и ОФС 42-0008-02**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на настойки гомеопатические матричные, в том числе настойки матричные ферментированные и на глицерине.

Настойки гомеопатические матричные представляют собой жидкие извлечения из свежего или высушенного сырья растительного и/или животного происхождения, смеси сока растений с этанолом, используемые для производства/ изготовления гомеопатических лекарственных средств.

В зависимости от используемого вида экстрагента, сырья и технологии различают три вида настоек гомеопатических матричных:

– настойки гомеопатические матричные – спиртовые и водно-спиртовые (настойки гомеопатические матричные);

– настойки гомеопатически матричные ферментированные;

– настойки гомеопатические матричные на глицерине.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

В качестве сырья для получения настоек гомеопатических матричных используют лекарственное растительное сырье (свежее или высушенное) или сырье животного происхождения.

В случае если в фармакопейной статье или нормативной документации для получения настойки гомеопатической матричной разрешено использование нескольких видов растений одного ботанического рода, используют один из видов или смесь разрешенных видов.

Размер частиц измельченного лекарственного растительного сырья или сырья животного происхождения и способ получения настойки указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Если не указано иначе, свежее лекарственное растительное сырье измельчают до образования кашицы, а высушенное – до частиц, размер которых указан в табл. 1 (для настоек гомеопатических матричных, получаемых способами 1-4).

Таблица 1 – Размер частиц высушенного сырья растительного происхождения в зависимости от его морфологической группы или содержащейся в нем группы БАВ

Вид используемого высушенного лекарственного растительного сырья	**Размер частиц, мм**
Листья, травы, цветки	4
Коры, побеги, подземные органы (корни, корневища, клубни, клубнелуковицы, луковицы и др.)	3
Плоды и семена	2
Растительное сырье, содержащее алкалоиды	1

Высушенное лекарственное растительное сырье, предназначенное для получения настоек гомеопатических матричных ферментированных, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, должно быть измельчено до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером не более 0,5 мм (ОФС «Ситовой анализ»).

Лекарственное растительное сырье должно соответствовать требованиям ОФС «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов».

В качестве сырья для получения настоек гомеопатических матричных на глицерине используют животных, их части или их выделения. При этом переработка частей высших животных (теплокровных) осуществляется непосредственно после убоя, низших животных умерщвляют непосредственно перед переработкой в токе углерода диоксида. Сырье животного происхождения должно соответствовать требованиям ОФС «Сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов».

При получении ферментированных настоек требуется соблюдение строго определенных условий: температурного режима, величины pH среды, продолжительности настаивания и режима перемешивания. Температурный режим (нагревание и охлаждение) поддерживают с помощью термостатов. Процесс экстракции интенсифицируют тщательным перемешиванием мацератов дважды в сутки.

Настойки гомеопатические матричные получают перколяцией или мацерацией этанолом указанной концентрации, мацерацией водой очищенной свежеприготовленной в присутствии меда или смеси меда с лактозой или свежеприготовленной молочной сывороткой, мацерацией глицерином в присутствии или без натрия хлорида в соответствии с приведенными ниже способами с указанием технологии получения последующих разведений (потенций).

Примечание. Молочную сыворотку готовят из свежего натурального сырого коровьего молока высшего сорта. Изготовление и методы испытания молочной сыворотки приведены в Приложении 1.

Для настаивания (мацерации) с применением спирта используют плотно закрывающиеся стеклянные емкости, а в случае ферментированных настоек гомеопатических матричных – плотно закрывающиеся грубокерамические.

Для выбора способа получения настойки гомеопатической матричной необходимо определить тип сырья, влажность и содержание сока в сырье.

Определение влажности (потери в массе при высушивании) свежего лекарственного растительного сырья для получения настоек способами 2 и 3, проводят в соответствии с ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Способы определения содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье приведены в ОФС «Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье».

Каждому способу получения настоек гомеопатических матричных соответствует определенный способ получения разведений (потенций).

Разведения (потенции) настоек гомеопатических матричных готовят по массе (м/м) в соотношении 1:10 (десятичная шкала) или 1:100 (сотенная шкала) при взбалтывании (потенцировании) с использованием в качестве разбавителя этанола определенной концентрации, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечание. Под «частями» в способах получения следует понимать массовые части.

Способы получения настоек гомеопатических матричных из свежего и высушенного лекарственного растительного сырья, грибов и сырья животного происхождения

Способ 1. Предусматривает получение настойки гомеопатической матричной из свежего лекарственного растительного сырья, содержащего не менее 70 % сока и не содержащего эфирных масел, смол и слизи.

Настойки гомеопатические матричные, полученные способом 1, представляют собой спиртовые извлечения из сока растений, полученные с использованием спирта этилового 86 % (м/м).

Мелко измельченное лекарственное растительное сырье отжимают под прессом. Полученный сок взвешивают и немедленно смешивают с равным количеством спирта этилового 86 % (м/м), взбалтывают и оставляют для настаивания в течение не менее 5 сут при температуре не выше 20 °С. После этого извлечение фильтруют.

В фильтрате определяют сухой остаток или проводят количественное определение основных групп биологически активных веществ.

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, то количество спирта этилового 43 % (м/м) в килограммах (E_1), необходимое для разбавления, вычисляют по формуле (1):

$$E_1 = \frac{m \cdot (B_x - B_o)}{B_o} \quad (1),$$

где m – масса фильтрата, кг;

B_x – содержание сухого остатка или содержание активных компонентов

в фильтрате, %;

B_0 – содержание сухого остатка или активных компонентов, регламентируемое фармакопейной статьей или нормативной документацией, %.

Фильтрат смешивают с рассчитанным количеством спирта этилового 43 % (м/м), отстаивают в течение не менее 5 сут при температуре не выше 20 °С и при необходимости фильтруют.

Содержание спирта этилового в настойке гомеопатической матричной составляет около 43 % (м/м).

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 2 частей настойки гомеопатической матричной и 8 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения (D1) и 9 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Первое сотенное разведение (C1) готовят из 2 частей настойки гомеопатической матричной и 98 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (C1) и 99 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 2. Предусматривает получение настойки гомеопатической матричной из свежего лекарственного растительного сырья, содержащего менее 70 % сока, с влажностью более 60 %, не содержащего эфирных масел, смол и слизи.

Настойки гомеопатические матричные получают методом мацерации. Лекарственное растительное сырье взвешивают, тщательно измельчают, отбирают пробу для определения влажности. Оставшееся измельченное лекарственное растительное сырье еще раз взвешивают и немедленно заливают не менее, чем половинным от массы взятого лекарственного растительного сырья количеством спирта этилового 86 % (м/м), перемешивают и оставляют в плотно закрытом сосуде при температуре не

выше 20 °С.

Необходимое количество спирта этилового 86 % (м/м) в килограммах (E_2), рассчитывают по формуле (2):

$$E_1 = \frac{m \cdot W}{100} \quad (2),$$

где m – масса лекарственного растительного сырья, кг;
W – влажность лекарственного растительного сырья, %.

От рассчитанного количества спирта этилового 86 % (E_2) вычитают количество ранее прибавленного спирта, и остаток спирта смешивают с полученной массой. Массу оставляют не менее, чем на 10 сут при температуре не выше 20 °С при периодическом встряхивании. Затем массу отжимают и фильтруют.

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает нормируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1.

Содержание спирта этилового в настойке составляет около 43 % (м/м).

Жидкие разведения готовят, как описано в способе 1.

Способ 2а. Предусматривает получение настойки гомеопатической матричной по способу 2 с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 62 % (м/м).

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый 30 % (м/м).

Содержание спирта этилового в настойке составляет около 30 % (м/м).

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 2 частей настойки гомеопатической матричной и 8 частей спирта этилового 30 % (м/м).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения (D1) и 9 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Первое сотенное разведение (С1) готовят из 2 частей настойки гомеопатической матричной и 98 частей спирта этилового 30 % (м/м).

Второе сотенное разведение (С2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (С 1) и 99 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 3. Предусматривает получение настойки гомеопатической матричной из свежего лекарственного растительного сырья с влажностью менее 60 % или содержащего эфирные масла, смолы и слизи, а также из свежих грибов.

Настойки гомеопатические матричные получают методом мацерации. Лекарственное растительное сырье взвешивают, определяют влажность, затем тщательно измельчают и полученную массу немедленно заливают не менее, чем половинным от массы лекарственного растительного сырья количеством спирта этилового 86 % (м/м), перемешивают и оставляют в плотно закрытом сосуде при температуре не выше 20 °С.

Необходимое количество спирта этилового 86 % в килограммах (E_3), рассчитывают по формуле (3):

$$E_1 = \frac{2 \cdot m \cdot W}{100} \quad (3),$$

где m – масса лекарственного растительного сырья, кг;

W – влажность лекарственного растительного сырья сырья, %.

От рассчитанного количества спирта этилового 86 % (E_3) вычитают количество ранее прибавленного спирта, и остаток спирта смешивают с полученной массой. Массу оставляют не менее чем на 10 сут при температуре не выше 20 °С при периодическом встряхивании, затем отжимают и фильтруют.

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый 62 % (м/м).

Содержание спирта этилового в настойке составляет около 60 % (м/м).

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 7 частей спирта этилового 62 % (м/м).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения (D1) и 9 частей спирта этилового 62 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично, используя для получения третьего десятичного разведения спирт этиловый 62 % (м/м), а с четвертого десятичного разведения – спирт этиловый 43 % (м/м).

Первое сотенное разведение (C1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 97 частей спирта этилового 62 % (м/м).

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (C1) и 99 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 3а. Настойки гомеопатические матричные получают по способу 3, используя в качестве экстрагента спирт этиловый 73 % (м/м).

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый 43 % (м/м).

Содержание спирта этилового в настойке составляет около 43 % (м/м).

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 7 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения (D1) и 9 частей спирта этилового 30 % (м/м).

Третье десятичное разведение (D3) готовят из 1 части второго десятичного разведения (D2) и 9 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Первое сотенное разведение (C1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 97 частей спирта этилового 43 % (м/м).

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (C1) и 99 частей спирта этилового 30 % (м/м). Третье сотенное

разведение (С3) готовят из 1 части второго сотенного разведения (С2) и 99 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 3б. Настойки гомеопатические матричные получают по способу 3, используя в качестве экстрагента спирт этиловый 43 % (м/м).

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый 30 % (м/м).

Содержание спирта этилового в настойке составляет около 30 % (м/м).

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 7 частей спирта этилового 30 % (м/м).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения (D1) и 9 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Первое сотенное разведение (С1) готовят из 3 частей настойки гомеопатической матричной и 97 частей спирта этилового 30 % (м/м).

Второе сотенное разведение (С2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (С1) и 99 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 4. Настойки гомеопатические матричные получают из высушенного лекарственного растительного сырья и грибов, свежего сырья животного происхождения.

Настойки гомеопатические матричные получают мацерацией из 1 части лекарственного растительного сырья или сырья животного происхождения и 10 частей спирта этилового в концентрации, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Количество спирта этилового, израсходованное на предварительную обработку свежего сырья животного происхождения (умерщвление насекомых, измельчение и т.д.), вычитают из общего количества спирта,

необходимого для получения настойки.

Сырье, измельченное до необходимой величины, смешивают со спиртом этиловым в предписанной концентрации и оставляют в закрытом сосуде при ежедневном взбалтывании при температуре не выше 20 °С в течение не менее 8 сут, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации. После этого извлечение сливают, сырье отжимают (лекарственное растительное сырье и грибы – под прессом), отжатую жидкость объединяют с извлечением и фильтруют.

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый в предписанной концентрации или концентрации, используемой для получения настойки.

Настойка гомеопатическая матричная соответствует первому десятичному разведению D1.

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части настойки матричной гомеопатической (D1) и 9 частей спирта этилового в концентрации, используемой для получения настойки.

Третье десятичное разведение (D3) готовят из 1 части второго десятичного разведения (D2) и 9 частей спирта этилового в концентрации, используемой для получения настойки.

Начиная с четвертого десятичного разведения (D4) используют спирт этиловый 43 % (м/м), если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, и готовят аналогично предыдущим десятичным разведениям.

Первое сотенное разведение (C1) готовят из 10 частей настойки матричной гомеопатической (D1) и 90 частей спирта этилового в концентрации, используемой для получения настойки.

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части первого сотенного разведения (C1) и 99 частей спирта этилового 43 % (м/м), если не указано

иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Последующие разведения готовят аналогично.

Способ 4а. Настойки гомеопатические матричные получают из высушенного лекарственного растительного сырья или сырья животного происхождения методом перколяции.

Одну часть высушенного измельченного лекарственного растительного сырья или сырья животного происхождения заливают 5 частями спирта этилового в концентрации, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации, и настаивают в течение 2 сут при частом взбалтывании. Подготовленное сырье достаточно плотно укладывают в перколятор. Затем, при открытом спускном кране, добавляют такое количество спирта этилового той же концентрации, чтобы слой его над поверхностью сырья составлял 1-3 см (вытекающую из крана жидкость наливают обратно в перколятор). После этого перколят с определенной скоростью выпускают из крана, непрерывно доливая в перколятор такое количество спирта этилового, чтобы на 1 часть сырья приходилось 10 частей спирта этилового, и над сырьем был его постоянный слой. Процесс перколяции продолжают до получения 10 частей извлечения, которое отстаивают в течение 8 сут, фильтруют, взвешивают фильтрат и определяют в нем содержание сухого остатка или активных компонентов.

Примечание. Следует соблюдать следующую скорость вытекания извлечения из перколятора при загрузке сырья:

- до 1 кг: 10-15 капель/мин;
- до 2 кг: 20-25 капель/мин;
- до 3 кг: 30-35 капель/мин;
- до 10 кг: 40-70 капель/мин.

Если содержание сухого остатка или активных компонентов превышает регламентируемую фармакопейной статьей или нормативной документацией величину, проводят разбавление настойки способом, указанным в способе 1, используя спирт этиловый в предписанной концентрации или концентрации, используемой для получения настойки.

Настойка гомеопатическая матричная соответствует первому

десятичному разведению D1.

Жидкие разведения готовят, как описано в способе 4.

Способы получения настоек гомеопатических матричных ферментированных

Способы 5.1-5.5. Настойки гомеопатические матричные ферментированные получают из свежего лекарственного растительного сырья.

Смешивают 100 частей измельченного свежего лекарственного растительного сырья с определенными количествами воды, меда и лактозы моногидрата. Количества (в частях) меда, лактозы моногидрата и воды, необходимые для получения настоек гомеопатических матричных ферментированных способами 5.1-5.5, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Соотношение частей основных компонентов, используемых для получения настойки гомеопатической матричной ферментированной в зависимости от используемого способа (из расчета на 100 частей измельченного свежего лекарственного растительного сырья)

№ способа	Мед	Лактоза моногидрат	Вода
5.1	0,75	0,75	50
5.2	0,75	0,75	75
5.3	0,75	0,75	125
5.4	0,75	0,75	200
5.5	0,75	0,75	275

Измеряют величину pH смеси и оставляют для настаивания при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 3,5 суток. Ежедневно утром и вечером определяют величину pH мацерата и охлаждают его в смеси воды со льдом (температура не выше 4 °С), каждый раз в течение 2 ч. Непосредственно до и после охлаждения мацерат перемешивают. Все остальное время его выдерживают в плотно закрытых сосудах при температуре (37 ± 0,5) °С. Как только величина pH начинает снижаться, нагревание прекращается, мацерат оставляют при комнатной температуре, продолжая ежедневно, утром и вечером по 2 ч охлаждать его в смеси воды со льдом, определять величину

pH, тщательно перемешивать до и после охлаждения. По истечении 3,5 сут, во время очередного охлаждения, растительное сырье отжимают, используя стерильную ткань (суровое полотно и др.). Отжатое лекарственное растительное сырье высушивают на воздухе. Далее его тщательно перемешивают, 3-5 г помещают в фарфоровый тигель и сжигают при температуре темно-красного каления (около 700 °С) до получения золы. В течение последующих 3,5 сут жидкое извлечение выдерживают при комнатной температуре, продолжая ежедневно утром и вечером определять величину pH, по 2 ч охлаждать в смеси воды со льдом, тщательно перемешивать до и после охлаждения. По истечении 3,5 сут извлечение фильтруют через стерильную ткань, определяют величину pH и объем фильтрата (фильтрат, как правило, мутный). Затем полученный фильтрат смешивают с золой (из расчета 0,05 г золы на 100 мл), смесь помещают в прохладное защищенное от света место и настаивают не менее 6 мес; образующийся при настаивании осадок не используют.

Способы 6.1-6.3. Настойки гомеопатические матричные ферментированные получают из свежего или высушенного лекарственного растительного сырья.

Делят 100 частей измельченного свежего (способы 6.1 и 6.3) или высушенного (способ 6.2) лекарственного растительного сырья и определенные количества воды, меда и, если указано лактозы моногидрата на 7 порций.

Количества (в частях) меда, лактозы моногидрата и воды, необходимые для получения настоек гомеопатических матричных ферментированных способами 6.1-6.3, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Соотношение частей основных компонентов, используемых для получения настойки гомеопатической матричной ферментированной в зависимости от используемого способа (из расчета на 100 частей измельченного лекарственного растительного сырья)

№ способа	Вода	Мед	Лактоза моногидрат

6.1	500	0,75	Не прибавляют
6.2	500	0,75	Не прибавляют
6.3	200	1,5	1,5

Первое приготовление готовят утром из одной порции измельченного лекарственного растительного сырья, воды, меда, и лактозы моногидрата (способ 6.3) и настаивают при температуре (37±0,5)°С. Вечером смесь охлаждают в воде со льдом в течение 2 час при тщательном перемешивании до и после охлаждения. После этого смесь вновь помещают для настаивания при температуре (37 ± 0,5) °С. Через 24 часа первую порцию лекарственного растительного сырья отделяют, отжимают, используя стерильную ткань.

Полученное извлечение смешивают со вторыми порциями лекарственного растительного сырья, воды, меда, лактозы моногидрата. Смесь настаивают при температуре (37 ± 0,5) °С. Вечером смесь охлаждают в воде со льдом в течение 2 час при перемешивании непосредственно до и после охлаждения. Через 24 часа (утром) растительное сырье отжимают через стерильную ткань.

Далее аналогичным образом обрабатывают оставшиеся 5 порций лекарственного растительного сырья, воды, меда, лактозы моногидрата в течение последующих 5 суток.

Извлечение, полученное после обработки седьмой порции лекарственного растительного сырья, оставляют для отстаивания (в течение не менее 2-3 час), после чего фильтруют через стерильную ткань. Определяют объем полученного фильтрата (фильтрат, как правило, мутный).

Отжатое лекарственное растительное сырье высушивают на воздухе. Далее его тщательно перемешивают, 3-5 частей сырья помещают в фарфоровый тигель и сжигают при температуре темно-красного каления (около 700 °С) до получения золы. Затем полученный фильтрат смешивают с золой (из расчета 50 мг золы на 100 г фильтрата), смесь помещают в

прохладное, защищенное от света место и настаивают не менее 6 месяцев; образующийся при настаивании осадок не используют.

Способы 7.1-7.5. Настойки гомеопатические матричные ферментированные получают из свежего растительного сырья.

Смешивают 100 частей измельченного свежего лекарственного растительного сырья с определенными количествами воды и молочной сыворотки. Необходимые для получения настойки гомеопатической матричной ферментированной количества молочной сыворотки и воды указаны в таблице 4. Измеряют величину pH смеси и далее поступают, как указано в способах 5.1-5.5.

Таблица 4 – Количества (в частях) молочной сыворотки и воды, необходимые для получения настоек гомеопатических матричных ферментированных способами 7.1-7.5

№ способа	Молочная сыворотка	Вода
7.1	50	Не прибавляют
7.2	50	25
7.3	50	75
7.4	15	110
7.5	50	225

Способ 8. Настойки гомеопатические матричные ферментированные получают из высушенного лекарственного растительного сырья.

100 частей измельченного высушенного лекарственного растительного сырья, 300 частей воды и 200 частей молочной сыворотки делят на семь порций, и далее изготавливается настойка в соответствии с требованиями, определенными способами 6.1-6.3.

Разведения (потенции) из настоек гомеопатических матричных ферментированных готовят по массе на воде очищенной свежеприготовленной при встряхивании (потенцировании).

Первое десятичное (D1) или первое сотенное разведение (C1) готовят из 1 части настойки гомеопатической матричной ферментированной и 9 или

99 частей воды.

Второе десятичное (D2) или второе сотенное (C2) разведение готовят из 1 части первого десятичного (D1) или первого сотенного (C1) разведения и 9 или 99 частей воды.

Последующие разведения готовят из 1 части предыдущего десятичного или сотенного разведения и 9 или 99 частей воды.

Способы получения настоек гомеопатических матричных на глицерине

Способ 9а. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - убитых животных или свежезабитых теплокровных животных или их частей и глицерина.

Для получения первого десятичного (D1) разведения или первого сотенного (C1) разведения 1 часть мелко измельченного исходного сырья смешивают с 9 частями (для D1) или 99 частями (для C1, соответствующему D2) глицерина 85 % и встряхивают. Перед измельчением допускается в обоснованных случаях прибавление 1 части глицерина 85 % к 1 части исходного сырья. В случае необходимости осадок отфильтровывают.

Настойка гомеопатическая матричная на глицерине соответствует первому десятичному разведению (D1).

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части матричной настойки и 9 частей глицерина 85 % или спирта этилового 15 % (м/м).

Третье десятичное разведение (D3) готовят из 1 части второго десятичного или первого сотенного разведения (C1, соответствует D2) и 9 частей спирта этилового 15 % (м/м).

Последующие разведения готовят аналогично.

Второе сотенное (C2) разведение готовят из 1 части первого сотенного разведения (C1, соответствует D2) и 99 частей спирта этилового 15 % (м/м). Последующие разведения готовят аналогично.

Если второе десятичное разведение (D2) готовят со спиртом этиловым

15 % (м/м), это должно быть указано в маркировке.

Способ 9б. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - убитых животных или свежезабитых теплокровных животных или их частей и глицерина.

Для получения матричной настойки 1 часть мелко измельченного животного происхождения смешивают с 2,1 частями глицерина 85 % и встряхивают. В случае необходимости смесь фильтруют.

Первое десятичное разведение (D1) готовят из 3 частей матричной настойки и 7 частей воды очищенной.

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части первого десятичного разведения и 9 частей воды очищенной.

Последующие разведения готовят аналогично.

В случае приготовления инъекционных растворов используют воду для инъекций вместо воды очищенной.

Водные разведения, приготовленные по способу 9б, должны иметь в маркировке указание «водное».

Настойки гомеопатические матричные на глицерине, полученные по способу 9б используют для приготовления: жидких разведений для инъекций, капель глазных, смесей гомеопатических.

Способ 10а. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - животных, частей животных или их выделений и глицерина, содержащего натрия хлорид.

1 часть мелко измельченного сырья животного происхождения смешивают с 5 частями натрия хлорида раствора 1,5 % в воде очищенной, затем прибавляют 95 частей глицерина. Смесь перемешивают и оставляют для настаивания в защищенном от света месте при температуре не выше 20 °С в течение не менее 7 и не более 21 сут при периодическом перемешивании. Затем жидкость декантируют и при необходимости фильтруют через марлю. Фильтрат является настойкой гомеопатической матричной. Настойка гомеопатическая матричная соответствует второму

десятичному разведению (D2) или первому сотенному разведению (C1).

При стоянии возможно образование осадка, который перед дальнейшей переработкой необходимо суспендировать.

В качестве растворителя для приготовления разведений используют раствор, состоящий из 0,2 частей натрия гидрокарбоната и 8,8 частей натрия хлорида в 991 части воды очищенной. В случае приготовлении инъекционных растворов используют воду для инъекций вместо воды очищенной.

Третье десятичное разведение (D3) готовят из 1 части настойки гомеопатической матричной (D2) и 9 частей растворителя. Последующие разведения готовят аналогично.

Разведения, используемые для получения инъекционных растворов, готовят следующим образом: четвертое десятичное разведение (D4) готовят из 1 части третьего десятичного (D3) разведения, 5,6 частей растворителя и 3,4 частей воды для инъекций.

Последующие разведения готовят, используя вышеуказанный растворитель.

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части настойки матричной (C1) и 99 частей растворителя.

Последующие десятичные и сотенные разведения готовят аналогично, используя тот же растворитель.

Способ 10б. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - животных, частей животных или их выделений и глицерина, содержащего натрия хлорид.

1 часть мелко измельченного сырья животного происхождения смешивают с 5 частями раствора натрия хлорида 4 % в воде очищенной, затем прибавляют 95 частей глицерина. Далее поступают, как указано в способе 10а.

Настойка гомеопатическая матричная соответствует второму десятичному разведению (D2) или первому сотенному разведению (C1).

В качестве растворителя для приготовления разведений используют раствор, состоящий из 0,2 частей натрия гидрокарбоната и 8,8 частей натрия хлорида в 991 части воды очищенной. В случае приготовлении инъекционных растворов используют раствор аналогичного состава, приготовленный на воде для инъекций.

Разведения готовят, как указано в способе 10а, используя вышеуказанный растворитель.

Способ 10в. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - из животных, частей животных или их выделений и глицерина, содержащего натрия хлорид.

1 часть мелко измельченного сырья животного происхождения смешивают с 5 частями натрия хлорида раствора 8 % в воде очищенной, затем прибавляют 95 частей глицерина. Далее поступают, как указано в способе 10а.

Настойка гомеопатическая матричная соответствует второму десятичному разведению (D2) или первому сотенному разведению (C1).

В качестве растворителя для приготовления разведений используют раствор, состоящий из 0,2 частей натрия гидрокарбоната и 8,8 частей натрия хлорида в 991 части воды очищенной. В случае приготовлении инъекционных растворов используют воду для инъекций вместо воды очищенной.

Разведения готовят, как указано в способе 10а, используя вышеприведенный растворитель.

Способ 10г. Настойки гомеопатические матричные на глицерине получают из сырья животного происхождения - составных частей крови лошади.

Отбор крови для получения составных частей производится ветеринарным врачом от живых лошадей. Кровь животного, полученная при убое скота, не должна использоваться. У животного отбирают 200 мл крови и каждый мл крови смешивают с 15 МЕ гепарина натрия и 0,625 мл натрия

хлорида раствора 0,9 %. Из полученной смеси отделяют различные компоненты крови с помощью центрифуги для фракционирования и каждую индивидуальную фракцию ресуспендируют с 1,1 мл натрия хлорида раствора 0,9 % в воде очищенной, получают клеточную суспензию.

Для получения настойки гомеопатической матричной 1 часть полученной клеточной суспензии смешивают с 5 частями натрия хлорида раствора 0,15 % в воде очищенной и прибавляют 95 частей глицерина. Смесь оставляют в защищенном от света месте при температуре не выше 20 °С в течение не менее 7 и не более 21 сут. Затем жидкость декантируют и при необходимости фильтруют через марлю. Фильтрат является матричной настойкой.

Настойка гомеопатическая матричная на глицерине соответствует второму десятичному разведению (D2) или первому сотенному разведению (С1).

При стоянии возможно образование осадка, который перед дальнейшей переработкой необходимо суспендировать.

В качестве растворителя для приготовления разведений используют раствор, состоящий из 0,2 частей натрия гидрокарбоната и 8,8 частей натрия хлорида в 991 части воды очищенной. В случае приготовления инъекционных растворов используют воду для инъекций вместо воды очищенной.

Третье десятичное разведение (D3) готовят из 1 части настойки гомеопатической матричной (D2) и 9 частей растворителя. Последующие разведения готовят аналогично.

Второе сотенное (С2) разведение готовят из 1 части настойки гомеопатической матричной (С1) и 99 частей растворителя. Последующие разведения готовят аналогично.

Настойки гомеопатические матричные и их разведения, полученные по способам 9а, 10а, 10б, 10в, 10г используют для приготовления: тритураций, жидких разведений для инъекций, мазей, суппозиториев, глазных капель,

гранул, а также смесей гомеопатических.

ИСПЫТАНИЯ

Требования, предъявляемые к качеству настоек гомеопатических матричных, приведены в ОФС «Настойки».

Настойки гомеопатические матричные оценивают по показателям: «Описание», «Плотность», «Метанол и 2-пропанол», «Подлинность», «Сухой остаток», «Тяжелые металлы», «Микробиологическая чистота», «Количественное определение» и другим показателям в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Для настоек гомеопатических матричных ферментированных проводят определение pH в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Количественное определение активных компонентов проводят в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

Настойки гомеопатические матричные, полученные из лекарственного растительного сырья, содержащего ядовитые и сильнодействующие компоненты, должны быть подвергнуты испытанию четвертого десятичного разведения («Испытание четвертого десятичного разведения») в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации.

В случае, если жидкие разведения настоек гомеопатических матричных на глицерине предназначены для производства стерильных лекарственных форм, они должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, приведены в ОФС

«Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Наименование настойки гомеопатической матричной должно содержать

Помимо общих требований, предусмотренных ОФС, дополнительно указывают: указывают наименование настойки на латинском и русском языке, надпись «настойка гомеопатическая матричная», количество настойки в миллилитрах, номер серии, условия хранения. Если настойка из высушенного сырья, в наименовании следует указывать способ получения.

Для настоек гомеопатических матричных ферментированных и их разведений (потенций) дополнительно указывают «ферментированные», используя аббревиатуру «ferm», и номер способа получения; для настоек гомеопатических матричных, полученных по способам 4а, 9а, 10б, 10в, 10г дополнительно указывают шкалу и степень разведения; для настоек гомеопатических матричных, полученных способом мацерации глицерином и их разведений (потенций), дополнительно указывают аббревиатуру «Gl» и номер способа получения.

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 °С. Настойки гомеопатические матричные ферментированные хранят, не отделяя от осадка, в течение не менее 6 месяцев; осадок не используют.

Приложение 1

Молочная сыворотка

Изготовление. Для изготовления молочной сыворотки используют свежее натуральное сырое коровье молоко высшего сорта (плотность не менее 1027 кг/м^3), полученное от здоровых животных и по качеству удовлетворяющее требованиям действующей нормативной документации.

Молоко указанного качества нагревают до кипения и кипятят в течение 5 мин. После охлаждения молоко заквашивают молочнокислыми микроорганизмами из семейства *Lactobacilaceae (Lactobacillus plantarum)* и выдерживают в защищенном от света месте при температуре около 25 °С в течение 3 сут. Сыворотку отделяют фильтрованием через стерильную ткань (два слоя марли и др.) (закваска).

В грубокерамический сосуд помещают 1 л свежего натурального сырого коровьего молока высшего сорта, прибавляют 10 мл полученной закваски и оставляют для сквашивания в защищенном от света месте при температуре около 25 °С в течение 3 сут. Образовавшийся самопрессованный прочный сгусток (не должен содержать пузырьков газа) отделяют, сыворотку фильтруют через стерильную ткань (два слоя марли и др.). Первые 100 мл фильтрата отбрасывают.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Свежеприготовленная молочная сыворотка не должна иметь запаха дрожжей или кислоты масляной.

pH. От 4,0 до 4,5 (ОФС «Ионометрия»).

Определение степени окраски. Окраска свежеприготовленной молочной сыворотки должна находиться в пределах окраски эталонов от GY_2 до GY_5 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 1).

Определение степени мутности. Опалесценция 10,0 мл свежеприготовленной сыворотки не должна быть интенсивнее, чем раствор сравнения из 1,5 мл раствора натрия хлорида (0,117 г/л), 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, 2,5 мл воды и 1,0 мл 1,7 % раствора серебра

нитрата.

Испытание проводят в пробирках с притертой пробкой из прозрачного бесцветного стекла с внутренним диаметром от 15 до 25 мм с плоским дном, через 5 мин после приготовления раствора сравнения, просматривая растворы перпендикулярно вертикальной оси пробирок на черном фоне при рассеянном дневном свете.

Хранение и срок годности. Молочную сыворотку используют свежеприготовленной. При необходимости использования сыворотки для изготовления нескольких последующих серий ферментированных настоек, ее хранят в защищенном от света месте, при температуре не выше 4 °С, в течение не более 48 ч.

Пластыри гомеопатические **ОФС.1.6.2.009.18**

Вводится впервые

Пластыри гомеопатические – лекарственная форма для наружного применения, обладающая способностью прилипать к коже и слизистым оболочкам, содержащая один или несколько активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

Пластыри гомеопатические состоят из клеевой основы или пластырной массы, которая может содержать одно или более активных компонентов в гомеопатических разведениях, нанесенных однородным слоем на подложку, изготовленную из природного материала.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Материал подложки не должен раздражать кожу или вызывать аллергическую реакцию. Клеевой слой должен быть защищен слоем, который удаляется перед нанесением пластыря. Защитный слой не должен отделять активный компонент от поддерживающего слоя. В состав пластырной массы в качестве основы в зависимости от назначения могут входить разрешенные к применению в медицинской практике натуральные жиры, воск, смолы, природные масла, каучук, церезин, вазелин и др. Введение синтетических антиоксидантов и консервантов не практикуется.

Для производства гомеопатических пластырей компоненты, входящие в пластырную массу, предварительно растворяют или расплавляют. При этом расплавляют вначале более тугоплавкие, а затем легкоплавкие вещества и их смешивают. Растворенную или расплавленную пластырную массу

процеживают. В охлажденную (полуостывшую) пластырную массу (температура 25 °С) или клеевую основу вводят настойки гомеопатические матричные, тритурации гомеопатические и/или их гомеопатические разведения. Летучие и пахучие компоненты добавляют в последнюю очередь.

ИСПЫТАНИЙ

Качество пластырей гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Пластыри медицинские».

В случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворы и жидкие разведения гомеопатические	**ОФС.1.6.2.0010.18** **Взамен ОФС 42-0026-05**

Растворы гомеопатические – растворы одного или нескольких активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

Жидкие разведения гомеопатические – разведения активных компонентов с учетом правил гомеопатических разведений в соответствующих растворителях или взаимосмешивающихся растворителей с гомеопатических лекарственных форм.

Растворы и жидкие разведения гомеопатические используются в качестве субстанций для производста/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов или в качестве лекарственных препаратов для внутреннего, наружного и местного применения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Жидкие разведения гомеопатические получают путем ступенчатого разбавления, сопровождающегося встряхиванием растворов гомеопатических, тритураций гомеопатических, настоек матричных гомеопатических.

Растворы и разведения гомеопатические готовят по массе.

В качестве растворителей применяют: воду очищенную, воду для инъекций, раствор натрия хлорида изотонический, глицерин, спирт этиловый или другой растворитель, указанный в фармакопейной статье или нормативной документации.

При производстве/изготовлении водно-спиртовых растворов и разведений в качестве растворителя используют спирт этиловый в

концентрации (м/м): 94 %, 86 %, 73 %, 62 %, 43 %, 30 %, 15 %, что соответствует концентрации (о/о) около: 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 36 %, 18,5 %. Таблица, указывающая количества воды (по массе) и спирта этилового 96-96,9 % (по объему), которые необходимо смешать для получения 1 кг спирта указанных концентраций приведена в Приложении 1. Концентрацию разведенного спирта определяют по плотности. Отклонения, допустимые в концентрации спирта при его разведении, приведены в Приложении 2.

Под «частями» в методах получения следует понимать массовые части.

Для получения разведений используют методы Ганемана, Корсакова и LM – метод.

Обозначение разведений:

- по Ганеману десятичные разведения (1:10) обозначают буквой «D», сотенные разведения (1:100) – буквой «С», с указанием числа ступеней разведения (потенцирования) арабскими цифрами;

- по Корсакову разведения обозначают буквой «К», с указанием числа ступеней разведения (потенцирования) арабскими цифрами;

LM – разведения (1:50000) обозначают буквами «LM», с указанием числа ступеней разведения (потенцирования) римскими цифрами.

Шкалы разведений:

Наименование шкалы	**Степень разведения**
Десятичная	1: 10
Сотенная	1 : 100
Пятидесятитысячная	1 : 50000

Растворы гомеопатические

Для приготовления растворов первого десятичного (D1) или первого сотенного разведения (С1) 1 часть субстанции растворяют в 9 частях или 99 частях растворителя и встряхивают (потенцируют), если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Особенности изготовления растворов и разведений гомеопатических указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Если нет указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, то при приготовлении растворы не должны нагреваться.

Если при получении раствора требуется использовать спирт 15 % (м/м), то первое десятичное разведение (D1) может быть получено следующим образом: 1 часть субстанции растворяют в 7,58 частях воды и прибавляют 1,42 части спирта 94 % (м/м). Для получения первого сотенного разведения (C1) 1 часть субстанции растворяют в 83,4 частях воды и прибавляют 15,6 частей спирта 94 % (м/м).

Разведения жидкие гомеопатические

Разведения готовят в помещении, защищенном от прямого солнечного света. Используют плотно закупоривающиеся стеклянные сосуды, объем которых на 1/2-1/3 больше объема разводимого активного компонента. В процессе изготовления каждое разведение потенцируют путем встряхивания (не менее 10 раз).

По методу Ганемана при производстве/изготовлении каждого десятичного и сотенного разведения используют отдельный сосуд.

Второе десятичное разведение (D2) готовят из 1 части раствора (D1) и 9 частей спирта 43 % (м/м), если не указан иной растворитель в фармакопейной статье или нормативной документации. Последующие разведения готовят аналогично.

Второе сотенное разведение (C2) готовят из 1 части раствора (C1) и 99 частей спирта 43 % (м/м), если не указан иной растворитель в фармакопейной статье или нормативной документации. Последующие разведения готовят аналогично.

В случае использования в качестве растворителя воды очищенной или воды для инъекций, в маркировке должно быть указано «водное». Водные

разведения должны, как правило, перерабатываться немедленно после их приготовления; они используются исключительно для получения готовых лекарственных форм: растворов инъекционных гомеопатических, мазей гомеопатических, суппозиториев гомеопатических, капель глазных гомеопатических. Водные разведения, предназначенные для получения мазей гомеопатических и суппозиториев гомеопатических, допускается готовить на воде очищенной.

Методы получения разведений настоек гомеопатических матричных приведены в ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

По методу Корсакова сотенные разведения готовят в одном и том же сосуде.

Первое сотенное разведение готовят в соответствии с методом, используемым при получении настойки гомеопатической матричной или субстанции.

В первый сосуд помещают отмеренное количество настойки или субстанции, прибавляют необходимое количество соответствующего растворителя (разбавителя) и встряхивают, в результате чего получают 1-е сотенное разведение. Полученное разведение переносят во второй сосуд с обозначением К1 путем переворачивания вверх дном или отсасывания. При процессе опорожнения сосуда должно удаляться 99 % раствора, оставляя в сосуде 1 %.

В первый сосуд, содержащий 1 часть 1-го сотенного разведения, прибавляют 99 частей разбавителя, встряхивают, в результате чего получают 2-е сотенное разведение по Корсакову К2. Полученное разведение переносят в третий сосуд с обозначением К2.

Аналогично получают все последующие разведения, вливая каждый раз 99 частей разбавителя в один и тот же первый сосуд до достижения требуемого разведения.

В случае нерастворимой субстанции первые три потенцированные тритурации производят/изготавливают с лактозой моногидратом по методу, приведенному в ОФС «Тритурации гомеопатические». Последующие разведения готовят, используя жидкий разбавитель, используя метод, приведенный выше.

Гомеопатический раствор, предназначенный для внутреннего применения в случае отсутствия в его составе спирта, может содержать другие компоненты, разрешенные к применению в гомеопатической практике.

LM – разведения (50-тысячные потенции) готовят из тритураций субстанций в третьем сотенном разведении (С3), путем последовательного потенцирования в соотношении 1:50000 и обозначают буквами «LM» (L – 50; M- 1000). В процессе изготовления каждое разведение потенцируют путем встряхивания 100 раз.

Для LM-разведений существует шкала от LM I до LM XXX, т.е. имеется 30 ступеней разведения (потенцирования). В отличие от десятичных и сотенных ступень разведения для шкалы LM-разведения обозначают римскими цифрами.

Для получения разведения LM I: – 0,06 г тритурации третьего сотенного разведения (С3) растворяют в 20 мл спирта 15 % (м/м) и встряхивают (соответствует 500 каплям). Одну каплю полученного раствора переносят в плотно закрывающийся сосуд вместимостью 5-10 мл, прибавляют 2,5 мл спирта 86 % (м/м) (соответствует 100 каплям) и энергично встряхивают 100 раз. Полученным разведением равномерно увлажняют 100 г гранул сахарных № 2 (470-530 гранул в 1 г) (ОФС «Гранулы гомеопатические»), после пропитывания в плотно закрывающемся сосуде гранулы высушивают на воздухе, при комнатной температуре до постоянной массы. Полученные гранулы соответствуют разведению LM I.

Для получения разведения LM II: - одну гранулу в разведении LM I переносят в плотно закрывающийся сосуд вместимостью 5-10 мл, растворяют

в одной капле воды очищенной, прибавляют 2,5 мл спирта 86 % (м/м) (соответствует 100 каплям) и энергично встряхивают 100 раз. Полученное разведение наносят на следующие 100 г гранул сахарных № 2, как указано выше.

Аналогично получают последующие LM – разведения.

Для получения жидких LM –разведений из LM –разведений гранул: одну гранулу, соответствующего LM–разведения, растворяют в 10 мл спирта 15 % (м/м). Получают раствор, LM–разведение которого соответствует LM–разведению гранулы, взятой для растворения.

Жидкие разведения (по Ганеману) из тритураций

Для изготовления разведений из тритураций используют два способа.

Способ 1. Для получения четвертого сотенного жидкого разведения (С4) 1 часть тритурации субстанции третьего сотенного разведения (С3) растворяют в 79 частей воды, прибавляют 20 частей спирта 86 % (м/м) и встряхивают. Пятое сотенное (С5) и все последующие сотенные разведения готовят из 1 части предыдущего сотенного разведения и 99 частей спирта 43 % (м/м) при встряхивании.

Способ 2. Для получения шестого десятичного жидкого разведения (D6) 1 часть тритурации субстанции четвертого десятичного разведения (D4) растворяют в 9 частях воды и встряхивают. Затем 1 часть полученного разведения встряхивают с 9 частями спирта 30 % (м/м).

Аналогично получают седьмое десятичное жидкое разведение (D7) из тритурации пятого десятичного разведения (D5), а восьмое десятичное жидкое разведение (D8) из тритурации шестого десятичного разведения (D6).

От девятого (D9) и выше десятичные разведения готовят из предыдущих десятичных разведений со спиртом 43 % (м/м) в соотношении 1:10.

Для получения шестого сотенного жидкого разведения (С6) 1 часть тритурации четвертого сотенного разведения (С4) растворяют в 99 г воды и

встряхивают. Затем 1 часть полученного разведения встряхивают с 99 частями спирта 30 % (м/м).

Аналогично получают седьмое сотенное разведение (С7) из тритурации пятого сотенного разведения (С5), а восьмое сотенное разведение (С8) из тритурации шестого сотенного разведения (С6).

От девятого (С9) и выше сотенные жидкие разведения готовят из предыдущего сотенного жидкого разведения с использованием спирта 43 % (м/м) в соотношении 1:100.

Жидкие разведения из тритураций D6, D7, С6 и С7, полученные по описанному методу, не должны использоваться для получения последующих разведений.

ИСПЫТАНИЯ

Качество растворов гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Растворы».

Растворы и разведения гомеопатические оценивают по показателям: «Описание», «Плотность», «Подлинность» (определяют подлинность активного компонента (если применимо) или вспомогательного компонента), «Микробиологическая чистота» и другим показателям в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Массу или объем содержимого упаковки при фасовке растворов и разведений определяют в соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки». Для растворов гомеопатических для приема внутрь определяют извлекаемый объем в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Растворы препаратов, содержащих первое, второе или третье десятичное разведение активного компонента/активных компонентов контролируют по показателям «Подлинность», «Количественное определение» в соответствии с фармакопейной статьей или нормативной документации.

Допустимые отклонения в содержании лекарственных веществ, не должны превышать ± 5 % для первого и второго десятичных разведений и

± 10 % для третьего десятичного разведения, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Четвертые десятичные разведения (D4), содержащие ядовитые и сильнодействующие вещества, должны выдерживать испытание на четвертичное десятичное разведение в соответствии с фармакопейной статьей или нормативной документацией. («Испытание на D 4»).

В том случае, если степень разведения активного компонента/ активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 ^{o}C, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворы и разведения, содержащие ядовитые или сильнодействующие вещества до третьего десятичного разведения, следует хранить в соответствии с действующими требованиями. Особые условия хранения указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Приложение 1

Количества по массе (в граммах) воды и спирта концентрации 96,0-96,9 % (о/о), которые необходимо смешать для получения 1000 г спирта концентрации 15 %, 30 %, 43 %, 62 %, 73 %, 86 % (м/м)

Концентрация взятого спирта, % (о/о)	15		30		43		62		73		86	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,0	160	840	320	680	458	542	661	339	778	222	917	83
96,1	160	840	319	681	458	542	660	340	777	223	915	85
96,2	159	841	319	681	457	543	659	341	775	225	914	86
96,3	159	841	318	682	456	544	658	342	774	226	912	88
96,4	159	841	318	682	455	545	657	343	773	227	911	89
96,5	159	841	317	683	455	545	656	344	772	228	909	91
96,6	158	842	317	683	454	546	655	345	771	229	908	92
96,7	158	842	316	684	453	547	654	346	770	230	907	93
96,8	158	842	316	684	453	547	653	347	768	232	905	95
96,9	158	842	315	685	452	548	652	348	767	233	904	96

Приложение 2

Отклонения, допустимые в концентрации спирта этилового при разбавлении

Определяемая концентрация (%) спирта этилового		Допустимые отклонения в концентрации (%) спирта этилового	
м/м	о/о	м/м	о/о
94	96,11	-	-
86	90,26	85,15-86,31	89,6-90,5
73	79,58	72,90-73,83	79,5-80,3
62	69,63	61,85-62,81	69,5-70,4
43	50,60	41,58-43,46	49,1-51,1
30	36,25	29,34-30,56	35,5-36,9
15	18,53	14,48-15,30	17,9-18,9

Растворы для инъекций гомеопатические **ОФС.1.6.2.0011.18**

Взамен ОФС 42-0025-05

Растворы для инъекций гомеопатические – стерильные водные или неводные растворы предварительно потенцированных одного или нескольких активных компонентов в соответствующем растворителе, предназначенные для инъекционного введения.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Растворы для инъекций гомеопатические могут содержать один или более компонентов в гомеопатических разведениях. Получение гомеопатических разведений, а также их смесей регламентировано требованиями ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Смеси гомеопатические», «Настойки гомеопатические матричные», «Настои и отвары гомеопатические».

Растворы для инъекций гомеопатические должны соответствовать требованиями ОФС «Стерильность», 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».

Растворители. В качестве растворителя, как правило, используют воду для инъекций.

При получении растворов инъекционных гомеопатических из разведений, содержащих спирт, на двух последних этапах (при

потенцировании по десятичной шкале) или на последнем этапе (при потенцировании по сотенной шкале) используют растворители, не содержащие спирт этиловый. Потенцирование или смешивание на этой стадии проводят с водой для инъекций или изотонирующим раствором, приготовленном на воде для инъекций.

Вспомогательные вещества. Для изотонирования, как правило, применяют натрия хлорид. Использование других вспомогательных веществ, таких как консерванты и стабилизаторы, не допускается.

ИСПЫТАНИЯ

Растворы инъекционные гомеопатические должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические».

При получении растворов инъекционных гомеопатических из разведений, содержащих спирт, их контролируют по показателю «Спирт этиловый»: остаточное содержание спирта этилового определяют в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах». Концентрация остаточного спирта не должна превышать допустимую норму – не более 0,5 % (не более 0,005 г в 1,0 г).

Подлинность и содержание активных компонентов, а также другие показатели, определяют в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

В случае если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения». Упаковка должна обеспечивать стерильность и стабильность при транспортировании и хранении в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В стерильной упаковке, обеспечивающей стабильность в течение указанного срока годности, в защищенном от света месте, при температуре от 8 до 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Сиропы гомеопатические	**ОФС.1.6.2.0012.18** **Взамен ОФС 42-0019-04**

Сиропы гомеопатические – сироп, содержащий один или несколько активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Сиропы гомеопатические готовят путём растворения сиропообразующего компонента в кипящей воде очищенной. Полученный сироп фильтруют в горячем виде в стерильную емкость. Концентрация сахара в сиропе должна быть не более 72 %

В остывший сироп (при температуре согласно технологическому регламенту) вводят настойки гомеопатические матричные или их разведения гомеопатические, тритурации и (или) их разведения гомеопатические.

В качестве консерванта для производства/изготовления сиропа гомеопатического может быть использован спирт, применение других консервантов не допустимо.

Полученный сироп гомеопатический фильтруют через плотную ткань или другой подходящий материал.

Концентрация сахара в лекарственном препарате должна быть не менее 64 %.

ИСПЫТАНИЯ

Сиропы гомеопатические должны соответствовать требованиям ОФС «Сиропы».

В случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 8 до 15 °С, если не указано иначе в фармакопейной статье или в нормативной документации.

Смеси гомеопатические	**ОФС.1.6.2.0013.18** **Взамен ВФС 42-3610-99**

Смеси гомеопатические представляют собой смеси однотипные смеси тритураций гомеопатических, настоек гомеопатических матричных, растворов гомеопатических или их разведений с различными вспомогательными веществами и предназначены для получения лекарственных препаратов.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Получение разведений (потенций) настоек гомеопатических матричных, растворов и тритураций гомеопатических регламентировано требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Тритурпции гомеопатические».

Степень разведения активных компонентов в смесях получают путем их последовательного ступенчатого разбавления (потенцирования) с применением предписанного вспомогательного вещества (растворитель, носитель), которое может быть добавлено в соотношении 1:10, 1:100 или в ином соотношении. Степень разведения активных компонентов в смесях соответствует числу ступеней их разведения при производстве смесей.

Смеси получают двумя способами.

Способ 1. Каждый активный компонент, входящий в состав смеси, предварительно потенцируют до необходимой степени разведения и затем предписанное количество (по массе) каждого полученного разведения смешивают до достижения однородности.

Способ 2. Смешивают предписанное количество (по массе) каждого активного компонента, взятого в разведении на ряд ступеней ниже конечного, и совместно потенцируют до необходимой степени их разведения в смеси.

При совместном потенцировании активных компонентов требуется соблюдать три основных правила.

Правило 1. Совместно потенцируют смеси, содержащие только жидкие гомеопатические разведения, при получении которых в качестве растворителя (или экстрагента) используется этанол различной концентрации и соблюдается соотношение 1:10 или 1:100. В состав таких смесей могут входить настойки гомеопатические матричные, жидкие разведения тритураций гомеопатических, растворы гомеопатические и/или их разведения.

На каждой ступени потенцирования 1 часть смеси взбалтывают с 9 или 99 частями этанола предписанной концентрации.

Если смеси предназначены для введения в состав лекарственных форм для парентерального применения или глазных капель, два последних десятичных разведения или последнее сотенное разведение потенцируют с использованием воды для инъекций или натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций. При получении таких смесей следует руководствоваться требованиями ОФС «Растворы инъекционные гомеопатические» и «Капли глазные гомеопатические».

Правило 2. Совместно потенцируют тритурации и жидкие гомеопатические разведения, полученные с использованием воды, водно-солевых или водно-глицериновых растворов в качестве растворителя (или экстрагента). В состав таких смесей могут входить водные растворы, водные разведения тритураций, настойки гомеопатические матричные, полученные из свежего или высушенного лекарственного растительного сырья способом мацерации и ферментации в смеси воды с молочной сывороткой, медом или

лактозой, настойки гомеопатические матричные, полученные мацерацией сырья животного происхождения в смеси глицерина с раствором натрия хлорида.

На каждой ступени потенцирования 1 часть смеси взбалтывают с 9 или 99 частями предписанного растворителя.

Если смеси предназначены для введения в состав лекарственных форм для парентерального применения или капель глазных, то два последних десятичных разведения или последнее сотенное разведение потенцируют с использованием воды для инъекций, изотонического раствора натрия хлорида, изотонического раствора, содержащего 0,2 части натрия гидрокарбоната, 8,8 частей натрия хлорида и 91 часть воды для инъекций или другого растворителя, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. При производстве таких смесей следует руководствоваться требованиями ОФС «Растворы инъекционные гомеопатические» и «Капли глазные гомеопатические».

При получении смесей для нанесения на исходные гранулы сахарные по способу 2, согласно ОФС «Гранулы гомеопатические», на последней ступени потенцирования применяют сироп сахарный 64 %.

Во всех других случаях для потенцирования смесей по правилу 2 используют воду для инъекций.

Правило 3. Совместно потенцируют смеси, содержащие только тритурации, изготовленные из порошков, настоек гомеопатических матричных, растворов и/или их разведений.

На каждой ступени потенцирования смешивают и растирают 1 часть смеси с 9 или 99 частями лактозы в соответствии с требованиями ОФС «Тритурации гомеопатические».

ИСПЫТАНИЯ

Качество смесей, входящих в состав гомеопатических лекарственных препаратов, регламентируется требованиями ОФС «Лекарственные формы

для гомеопатических лекарственных препаратов» и фармакопейными статьями или нормативной документации.

Смеси гомеопатические, предназначенные для получения лекарственных препаратов, контролируют по показателям: «Описание», включая характеристику агрегатного состояния, цвета, запаха и др., при необходимости характеризуют физические свойства (гигроскопичность и др., размер частиц), «Микробиологическая чистота». В смесях, приготовленных с использованием спирта, определяют плотность; в смесях, содержащих только тритурации, определяют однородность смешивания. Оценку качества по другим показателям проводят в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

В том случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам. Методики определения подлинности и количественного определения должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность смесей гомеопатических в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

Хранение смесей осуществляется в зависимости от их агрегатного состояния и принадлежности к той или иной лекарственной форме.

Спреи гомеопатические	**ОФС.1.6.2.0014.18**
	Вводится впервые

Спреи гомеопатические – жидкая дозированная лекарственная форма для наружного и местного применения, представляющая собой растворы, эмульсии или суспензии активного компонента, находящегося под давлением в герметичной упаковке, высвобождение из которой происходит за счет давления воздуха, создаваемого с помощью механического распылителя насосного типа или при сжатии полимерной упаковки.

Требования к качеству спреев гомеопатических, в том числе и вспомогательным веществам должны соответствовать требованиям, которые предъявляются в ОФС «Аэрозоли и спреи»

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Спреи гомеопатические готовят по массе, они могут содержать один или более активный компонент. В гомеопатических разведениях в качестве активных компонентов могут быть использованы: настойки гомеопатические матричные, растворы и жидкие разведения гомеопатические. В качестве растворителей для спреев чаще всего используется вода (очищенная, для инъекций), а в качестве изотонирующего агента – натрия хлорид. Для создания нужной среды используется, как правило, натрия дигидрофосфат и натрия гидрофосфат. В качестве консерванта – бензалкония хлорид.

Для спреев подъязычных допускается использование в качестве растворителя и консерванта спирта этилового, в концентрации, указанной в фармакопейной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Качество спреев гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Аэрозоли и спреи». Кроме того, спреи гомеопатические также должны оцениваться по следующим показателям:

Описание. Включает описание цвета, запаха, прозрачности, наличие или отсутствие опалесценции.

Подлинность. Оценивается подлинность активного компонента (если применимо) или вспомогательного вещества.

Спирт этиловый. Испытание проводят в том случае, если в качестве растворителя используется спирт этиловый. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах», 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.

Количественное определение.

Количественное определение приводят в фармакопейной статье или нормативной документации с указанием нормируемых значений по содержанию действующих веществ. В том случае если степень разведения активного компонента не позволяет определить подлинность или количественное содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

В случае введения консерванта проводят качественную оценку и определение количественного содержания антимикробного консерванта в соответствии с ОФС «Определение эффективности антимикробных консервантов» (категория 2).

Микробиологическая чистота. Для спреев назальных гомеопатических микробиологическая чистота должна соответствовать категории 2, для спреев подъязычных гомеопатических – категории 3А ОФС «Микробиологическая чистота».

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». Должна обеспечивать стабильность спреев гомеопатических при транспортировании и хранении в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации

Особые условия хранения указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Суппозитории гомеопатические **ОФС.1.6.2.0015.18**

Взамен ВФС 42-3191-98

Суппозитории гомеопатические – суппозитории, содержащие один или несколько активных компонентов в соответствующих гомеопатических разведениях.

Суппозитории гомеопатические содержат активные компоненты в гомеопатических разведениях, равномерно распределённых в суппозиторной основе.

В качестве активных компонентов могут быть использованы настойки гомеопатические матричные и/или разведения гомеопатические и/или их смеси, тритурации гомеопатические, производство/изготовление которых должно быть регламентировано требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Смеси гомеопатические», «Тритурации гомеопатические».

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

При производстве/изготовлении суппозиториев гомеопатических в качестве основ обычно применяют масло какао и гидрогенизированные жиры, другие основы должны быть указаны в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

Суппозитории для детей готовят, как правило, на основе масла какао или твёрдого жира типа А.

Активные компоненты (настойки гомеопатические матричные и/или их гомеопатические разведения, растворы и разведения гомеопатические, тритурации гомеопатические) вводят в основу, соблюдая соотношение 1:10

(десятичная) или 1:100 (сотенная шкала). При введении активные компоненты смешивают с основой непосредственно или после растворения или растирания с небольшим количеством расплавленной основы, воды, спирто-водно-глицериновой смеси, масла вазелинового или другого подходящего растворителя.

Масса одного суппозитория для детей должна быть около 1,0 г, для взрослых около 2,0 г. Допустимое отклонение в массе одного суппозитория от средней массы не должно превышать ± 5 % в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Активные компоненты в жидкой форме, не содержащие летучих активных компонентов, перед смешиванием с основой могут быть сконцентрированы путем упаривания (в вакуум-выпарном аппарате).

Термолабильные активные компоненты добавляют к основе, непосредственно перед формированием суппозиториев.

Не допускается добавление поверхностно-активных веществ, консервантов и красителей.

Суппозитории гомеопатические формируют способом, выкатывания, прессования или выливания расплавленной массы в литьевые суппозиторные формы.

При формировании суппозиториев гомеопатических способом выкатывания в качестве связующего вещества применяют ланолин безводный.

ИСПЫТАНИЯ

Качество суппозиториев гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Суппозитории».

В том случае, если степень разведения активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата

в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В сухом, защищенном от света месте, при температуре 8 – 15 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

Таблетки гомеопатические **ОФС.1.6.2.0016.18**

Вводится впервые

Таблетки гомеопатические – твердая дозированная лекарственная форма, полученная прессованием, состоящая из одного или нескольких активных компонентов в гомеопатических разведениях и вспомогательных веществ.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Таблетки гомеопатические могут быть получены прессованием одного или более предварительно потенцированных активных компонентов со вспомогательными веществами (способ 1) или насыщением таблеток, полученных путем предварительного прессования, разведениями одного или нескольких активных компонентов (способ 2).

Способ 1. Таблетки гомеопатические получают прессованием тритураций гомеопатических, отвечающих требованиям ОФС «Тритурации гомеопатические», со вспомогательными веществами, по технологиям, общепринятым при производстве/изготовлении таблеток. Если в процессе производства/изготовления необходимо гранулирование, то в качестве гранулирующей жидкости используют воду очищенную, а также спирт предписанной концентрации.

В качестве вспомогательных веществ используют лактозу, сахарозу или другие вспомогательные вещества согласно ОФС «Таблетки».

Масса гомеопатических тритураций в одной таблетке, как правило, должна составлять 0,1 г или 0,25 г, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Вспомогательные вещества добавляют к этой массе.

Способ 2. Таблетки гомеопатические получают насыщением таблеток, полученных путем предварительного прессования лактозы, сахарозы или других подходящих вспомогательных веществ, в соответствии с технологией способа 1, гомеопатическими разведениями одного или нескольких активных компонентов.

ИСПЫТАНИЯ

Качество таблеток гомеопатических оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки».

В случае, если степень потенцирования активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Упаковка должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В сухом, защищенном от света месте, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тритурации гомеопатические	**ОФС.1.6.2.0017.18** **Взамен ОФС 42-0024-04**

Тритурации гомеопатические – твердая лекарственная форма в виде порошка, состоящая из одного или нескольких измельченных активных компонентов и/или их разведений со вспомогательным веществом.

Тритурации применяют в качестве субстанций для получения других гомеопатических лекарственных форм и в качестве лекарственного препарата для приема внутрь.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ

Получение тритураций массой до 1 кг производят вручную с использованием фарфоровой ступки. Особые условия производства/изготовления тритураций должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Исходные активные компоненты предварительно измельчают до размера частиц, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение размера частиц проводят в соответствии с требованиями ОФС «Ситовой анализ».

При приготовлении тритураций время и интенсивность растирания выбирают таким образом, чтобы размер полученных частиц исходного вещества в первом десятичном (D1) или первом сотенном (C1) разведении не превышал 100 мкм.

В качестве вспомогательного вещества используют лактозы моногидрат, если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иное.

Получение тритураций в количестве более 1 кг производят механическим способом. В случае использования специального оборудования оно должно обеспечивать получение тритураций, качество которых соответствует требованиям, приведенным в разделе «Испытания».

Тритурации производят/изготавливают по массе. При отсутствии специальных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации применяют следующие способы получения.

Способ 1 предназначен для получения тритураций из твердых субстанций.

Способ 2 предназначен для получения тритураций из настоек гомеопатических матричных, растворов и жидких гомеопатических разведений.

Способ 1. Получение тритурации из твердых субстанций.

Для получения тритураций вручную до четвертого десятичного (D4) или четвертого сотенного (C4) разведения включительно поступают следующим образом. Необходимое количество лактозы моногидрата делят на 3 равные части. Первую часть помещают в ступку и растирают, чтобы закрыть поры ступки. Затем прибавляют все количество активного компонента, растирают с усилием в течение 6 мин, после чего порошок сгребают неметаллическим шпателем и соскабливают со стенок ступки в течение 4 мин, эту операцию повторяют еще раз. Затем добавляют последовательно вторую и третью части лактозы моногидрата, повторяя с каждой частью описанные выше операции. Минимальное время, требуемое для всего процесса производства/изготовления тритурации, составляет не менее 1 ч.

Аналогично поступают при получении последующих разведений.

При механическом способе производства/изготовления тритураций из порошков до четвертого десятичного (D4) или четвертого сотенного (C4) разведения включительно активные компоненты и вспомогательные вещества добавляют и растирают, соблюдая последовательность операций, аналогичную указанной при изготовлении в ступке, и весь процесс получения тритурации составляет не менее 1 ч.

Для получения разведений выше пятого десятичного (D5) или пятого сотенного (C5), в отличие от описанного метода, поступают следующим образом. Разведения получают из 1 г тритурации предыдущего десятичного или сотенного разведения и 9 г или 99 г лактозы моногидрата, предварительно разделенного на 3 равные части. К первой части лактозы моногидрата постепенно, небольшими порциями прибавляют все количество тритурации предыдущего разведения и тщательно растирают до получения однородного порошка. Затем добавляют последовательно вторую и третью части лактозы моногидрата и тщательно растирают до однородности.

После длительного хранения тритурации вновь растирают.

Способ 2. Получение тритурации из настоек гомеопатических матричных, растворов и жидких гомеопатических разведений

При производстве/изготовлении (вручную или механическим способом) тритурации с настойками, растворами или жидкими разведениями поступают следующим образом. Ко всему необходимому количеству лактозы моногидрата постепенно, небольшими порциями прибавляют все количество настойки, раствора или жидкого предыдущего разведения и тщательно смешивают до получения однородной массы. Гомогенную влажную смесь осторожно высушивают, при необходимости измельчают и еще раз смешивают.

Используют такое количество лактозы моногидрата, чтобы после завершения процесса изготовления была достигнута предписанная масса тритурации.

Настойки гомеопатические матричные, растворы и жидкие гомеопатические разведения, используемые для получения тритураций, должны потенцироваться в соотношениях, соответствующих их способам получения. При этом, всегда используют столько лактозы моногидрата, чтобы общая масса тритурации после высушивания составляла для десятичного разведения 10 частей и для сотенного разведения 100 частей.

Последующие разведения тритураций из настоек, растворов или жидких гомеопатических разведений получают из 1 части тритурации предыдущего разведения и 9 частей (для десятичной шкалы) или 99 частей (для сотенной шкалы) лактозы, тщательно смешивая до однородности.

ИСПЫТАНИЯ

Тритурации гомеопатические контролируют по показателям качества: «Описание» (внешний вид, цвет, запах), «Однородность смешивания», «Размер частиц», «Микробиологическая чистота».

В тритурациях первого, второго или третьего десятичного разведения подлинность и содержание лекарственного вещества определяют согласно требованиям фармакопейной статье или нормативной документации.

Допустимые отклонения в содержании активного компонента, не должны превышать:

- $\pm$ 5 % для первого и второго десятичных разведений;

- $\pm$ 10 % для третьего десятичного разведения, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание активных компонентов в тритурациях с ядовитыми или сильнодействующими активными компонентами в четвертом десятичном (D4) разведении определяют согласно фармакопейной статье или нормативной документации.

Однородность смешивания. Определяют в тритурациях, содержащих металлы, уголь, графит, красящие активные компоненты. Три пробы по 1 г тритурации, взвешенные с точностью до $\pm$ 0,01 г, рассыпают тонким слоем (не более 0,5 мм) на листе белой бумаги и рассматривают на расстоянии 20-

25 см под лупой (увеличение от 7× до 9×), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Активный компонент должен быть равномерно распределен в тритурации и не должен обнаруживаться в виде отдельных частиц.

Размер частиц. Определяют с помощью микроскопа (А) или по величине внешней удельной поверхности (Б) в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

А. 10 мг средней пробы тритурации помещают на часовое стекло диаметром 60 – 70 мм, добавляют 0,5 мл масла вазелинового и тщательно размешивают стеклянной палочкой до получения однородной суспензии. Каплю суспензии, не давая осесть частицам, наносят на предметное стекло и прикрывают покровным стеклом. Размер частиц определяют при помощи окуляр-микрометра (увеличение 400×, 600×). Просматривают 10 полей зрения.

В тритурациях из порошков, содержащих активные компоненты в первом десятичном (D1) или первом сотенном (C1) разведении, 80 % частиц должны быть размером 10 мкм и менее, размер 20 % частиц должны быть размером не более 5 мкм; скопление отдельных частиц не учитываются.

Б. Величина внешней удельной поверхности тритурации, изготовленной с лактозой, должна быть не менее 0,65 $м^2/г$.

В случае, если степень разведения активного компонента/активных компонентов не позволяет установить их подлинность или определить содержание, качество препарата оценивают по вспомогательным веществам.

УПАКОВКА

Должна обеспечивать стабильность лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

МАРКИРОВКА

Требования, предъявляемые к маркировке, изложены в ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, при температуре от 15 до 25 °С, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Аллергены **ОФС.1.7.1.0001.15**

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 предназначаются 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 ± 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 магна (*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 инактивированных 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, сенсибилизированных 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, сенсибилизированных 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.

pH (для растворов и суспензий). Допустимое значение pH 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 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 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 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 Къельдаля 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».

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 биологических лекарственных препаратах».

Формальдегид (для аллергоидов). Не более 0,14 мг/мл. Определение проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических 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 биологических 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, пыльцевых, 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 пыльцевых аллергенов). Фосфатно-солевой буферный раствор, pH от 6,8 до 7,2.

Назначение – для разведения пыльцевых 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 ºС. Жидкие лекарственные препараты не допускается замораживать.

Бактериофаги **ОФС.1.7.1.0002.15**

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 бактериофаги 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, суппозиториев, линиментов, мазей (табл.)

Таблица - **Лечебно-профилактические бактериофаги и их целевая направленность**

Наименование препарата бактериофага	**Специфическая направленность**
Монокомпонентные	
Стафилококковый	*Staphylococcus* spp. *(S. aureus)*
Стрептококковый	*Streptococcus* spp. (в том числе, *Enterococcus* spp.)
Псевдомонас аеругиноза (синегнойный)	*Pseudomonas aeruginosa*
Коли	*Escherichia coli*
Протейный	*Proteus mirabilis* и *P. vulgaris*
Дизентерийный поливалентный	*Shigella flexneri* 1,2,3,4,6 сероваров; *S.sonnei*
Брюшнотифозный	*Salmonella typhi*
Сальмонеллезный гр. АВСДЕ	*S. typhimurium, S. paratyphi A, S.paratyphi B, S. heidelberg, S. newport, S. choleraesuis, S. oranienburg, S.infantis, S. dublin, S. enteritidis, S. anatum, S. newlands*
Клебсиелл пневмонии	*Klebsiella pneumoniae*
Комбинированные	
Коли-протейный	*E. coli, P. mirabilis* и *P. vulgaris*
Клебсиеллезный поливалентный	*K. pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis*
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. mirabilis, P.vulgaris, E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae*
Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный	*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. vulgaris, P.mirabilis, P. aeruginosa, K. pneumoniae, E. coli*
Пиобактериофаг комплексный	*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *P. mirabilis, P. vulgaris, E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae, K. oxytoca*
Интести	*S. flexneri 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, S. sonnei, S. typhimurium, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. heidelberg, S. newport, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. infantis, S. dublin, S. enteritidis, S. anatum, S. newlands, P. mirabilis* и *P. vulgaris, E.coli, Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*

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 раздельные 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. Возможно использование стандартных и высокопродуктивных штаммов, сохраняющих стабильность своих свойств в течение более длительного времени, при условии подтверждения стабильности свойств.

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 °С.

Производственные штаммы бактерий хранят в специальных изолированных помещениях в лиофилизированном состоянии в ампулах при температуре 2 – 8 °С 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 слаболизирующимся 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 ^{o}C 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 микрофильтрационные 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 ± 1) ^{o}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: pH, 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 ± 1) °С. 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 ± 1) °С 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 °С 0,7 % мясопептонного агара. Затем добавляют (0,2 ± 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 ± 1) °С. 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.

pH. Показатель pH 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 6,8 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».

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 (pH 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 5БII 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.

Бифидосодержащие пробиотики **ОФС.1.7.1.0003.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП) – 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 MC-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* M-17; *B.longum* BB-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 *Bifidobacterium*	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
Bifidobacterium bifidum 1	• Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), коллекционный номер штамма № 900791 • Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
B. bifidum 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
B. bifidum 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
B. adolescentis МС-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
B. longum B379M	• ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-2000 • Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
B. longum BB-46	• Chr.Hansen Culture Collection, Дания, номер депозита – 15958
B. longum 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 – АС 1665

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Название штамма	Описание морфологических, тинкториальных и культуральных свойств
B. bifidum 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 ± 1) ^{0}С 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 аэробиоза); 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 ± 1) ^{0}С, 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 *B. bifidum* 1 вызывает только закисление молока (до 40 – 50 ^{o}Т) без свертывания.
B. bifidum 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 ± 1) ^{0}С 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 аэробиоза); отдельные колонии бифидобактерий штамма *B.bifidum* ЛВА-3 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Отдельные колонии бифидобактерий штамма *B.bifidum* 791 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму «комет» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу. Оптимальная температура роста для обоих штаммов (38 ± 1) ^{0}С, 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.
B. adolescentis МС-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 ± 1) ^{0}С 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 аэробиоза); 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 ± 1) ^{0}C; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 56 – 72 ч.
B. longum 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 ± 1) ^{0}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 аэробиоза); 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 ± 1) ^{0}C. Оптимальная температура роста бифидобактерий (38 ± 1) ^{0}C; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16 – 20 ч.
B. longum 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 ± 1) ^{0}C образует круглые прозрачные белые колонии 1 мм в диаметре. Оптимальная температура роста бифидобактерий (38 ± 1) ^{0}C.
B. longum 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 ± 1) ^{0}C образует круглые белые прозрачные колонии 1 мм в диаметре. Оптимальная температура роста бифидобактерий (37 ± 1) ^{0}C.

Таблица 3– Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Свойства	Штаммы бактерий рода *Bifidobacterium*					
	B. bifidum			*B. adolescentis* МС-42	*B.longum* В379М	*B.longum* ВВ-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) ^{o}C	+	+	+	+	+	+
Разжижает желатин	-	-	-	-	-	-
Сквашивает молоко	-	+	+	+		
Продуцирует каталазу	-	-	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-	-	-
Адгезивная активность	+	+	+	+	+	+
Активность кислотообразования при культивировании в печеночной среде Блаурокка ^{o}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, $x10^{10}$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $x10^{9}$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $x10^{9}$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
B. bifidum 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		
B. adolescentis МС-42	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
B. longum B379M	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
B. longum ВВ-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 «Биотехнологические 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 суппозиториев). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев 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 суппозиториев 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, суппозиториев 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 ^oT (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 «Биотехнологические лекарственные препараты».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного препарата.

Вакцины и анатоксины **ОФС.1.7.1.0004.15**

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, инактивированные 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 инактивированные 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 инактивированные или живые вирусы или антигенные компоненты вирусов. Для получения инактивированных вирусных вакцин (цельновирионных, 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 $ТЦД_{50}$ (тканевые цитопатогенные дозы), ООЕ (оспообразующие единицы), $БОЕ_{50}$ (бляшкообразующие единицы), $ЭИД_{50}$ (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 адъювантах – 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 птицехозяйств, 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 сорбентах, 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 однодозовой 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 инактивации (для инактивированных 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 биологических 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 биологических 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 биологических 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 биологических 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.

К**олисодержащие пробиотики** **ОФС.1.7.1.0005.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП) – 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 *Escherichia coli*	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
E. coli М-17	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 240418
E. coli Г-35-1/59	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790059
E. coli Г-35-1/60	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790060
E. coli 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
E.coli M-17	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 ± 1) ^{0}С 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 ± 1) ^{0}С
E. coli Г-35-1/59	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 ± 1) ^{0}С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 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 ± 1) ^{0}С
E. coli Г-35-1/60	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 ± 1) ^{0}С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 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 ± 1) ^{0}С
E. coli Г-35-1/61	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 ± 1) ^{0}С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 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 ± 1) ^{0}С

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий *E. coli*

Свойства	Штаммы бактерий вида *Escherichia coli*			
	E. coli M-17	*E. coli Г-35-1/59*	*E. coli Г-35-1/60*	*E. coli 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 мочевину	-	-	-	-
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 *E.coli,* x10^{10} КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза живых *E.coli,* x10^{9} КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ пав-ших мышей	Вводимая доза инактиви-рованных *E. coli,* x10^{9} КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводи мая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
E. coli М-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		
E. coli 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		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
E. coli 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		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
E. coli 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 «Биотехнологические 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 «Биотехнологические лекарственные препараты».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

Лактосодержащие пробиотики **ОФС.1.7.1.0006.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП) – 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* 8Р-А3 или *L.acidophilus* La СН-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* $К_3Ш_{24}$) или к разным видам (например, *L.plantarum* и *L.acidophilus*), или на основе нескольких производственных штаммов бактерий разных родов или семейств (например, *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4 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 *Lactobacillus*	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
L.acidophilus 100аш	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3190
Lacidophilus $К_3Ш_{24}$	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3090
Lacidophilus NK_1	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8957 (В центральной лаборатории ВНИМИ № 22/10)
Lacidophilus NK_2	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8958
L.acidophilus NK_5	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8959
Lacidophilus NK_{12}	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8960
L.plantarum 8Р-А3	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900811
Lfermentum 90Т-С4	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900812
Lplantarum 7-19 (38)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), №790038
L.fermentum 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
L.acidophilus 100аш *L.acidophilus* $К_3Ш_{24}$	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспоровые 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.
L.acidophilus NK_1 *Lacidophilus* NK_2 *L.acidophilus* NK_5 *L.acidophilus* NK_{12}	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы; растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспоровые 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 МРС-5 в анаэробных или микроаэрофильных условиях через 48–72 ч штаммы образуют круглые без четких границ колонии.
L.plantarum 8Р-А3 *L.plantarum* 7-19	Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде МРС-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
L.fermentum 90Т-С4 *Lfermentum* 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 *Lactobacillus*			
	L.acidophilus 100аш, $К_3Ш_{24}$	*L.acidophilus* NK_1, NK_2 NK_5, NK_{12}	*L. plantarum* 8Р-А3, 7-19	*L.fermentum* 90Т-С4, 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, °С	(38±1)	(38±1)	(37±1)	(37±1)
Рост при температуре 61 °С	+	+	±	±
Рост при температуре 20 °С	+	+	+	+
Рост при температуре 15 °С	-	-	+	-
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	
	Вводимая доза, $x10^{10}$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $x10^{9}$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $x10^{9}$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
L. acidophilus 100аш $К_3Ш_{24}$ 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		
L. plantarum 8Р-А3,7-19 (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
L.fermentum 90Т-С4, 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 «Биотехнологические 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 суппозиториев и мазей). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют температуру плавления в соответствии с ОФС «Суппозитории», «Мази» и «Температура плавления» (метод 2), которая не должна превышать температуру 37 ^{0}C, если нет других указаний в нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации.

Для суппозиториев на липофильной основе 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 (для лиофилизатов, порошков, капсул, таблеток). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС

«Ионометрия». Указывается допустимый интервал значений pH; в случае определения pH 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, суппозиториев 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 «Биотехнологические лекарственные препараты».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК

ОФС.1.7.1.0007.15

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 используется 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 устанавливают на основе данных по изучению стабильности клеточной линии и которое нельзя превышать в процессе производства. Продукт собирается единовременно.

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 нежелательных 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 О-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 афинной 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 С-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 изоэлектрическое 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 использования готовых наборов реагентов, использование которых должно быть подтверждено материалами валидации методики.

Остаточная ДНК штамма-продуцента может быть определена методом гибридизации с зондами, меченными 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 (гельфильтрации) 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 апирогенным 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.

Пробиотики **ОФС.1.7.1.0008.15**

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 бутылях) 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».

pH. 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 37^0С, 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, суппозиториев, 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.

Споровые пробиотики **ОФС.1.7.1.0009.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП) – 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 *Bacillus*	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
B. subtilis 3	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2335
B licheniformis 31	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2336
B.subtilis 534	Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина РАН; ВКМ № 1666 Д
B.subtilis 3 H	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
B. subtilis 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) ^{o}C 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
B.licheniformis 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±1) ^{o}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
B.subtilis 534	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером 2,8·0,7 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±1) ^{o}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
B. subtilis 3 Н	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером (1,5–4,0)·(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±1) ^{o}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 *Bacillus*			
	B. subtilis 3	*B.licheniformis* 31	*B.subtilis* 3 Н	*B.subtilis* 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 ^oC	+	+	+	+
Рост при 65 ^oC	-	-	-	-
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	
	Вводимая доза, $\cdot 10^{10}$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $\cdot 10^{9}$ КОЕ/ 0,5мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, $\cdot 10^{9}$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
B. subtilis 3	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	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		
B. licheniformis 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	10/0	10	10/0	2,0	10/0	1,0	10/0
B. subtilis 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	10/0	10	10/0	2,0	10/0	1,0	10/0
B. subtilis 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	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	2,0	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 Цилю-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 «Биотехнологические 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 «Биотехнологические лекарственные препараты».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.

Биологические лекарственные препараты	**ОФС.1.7.1.0010.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на биологические лекарственные препараты. Биологические лекарственные препараты (БЛП) - лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического материала и для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов. К БЛП относятся:

- иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) - лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета либо диагностики наличия иммунитета (вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены) (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты»);
- лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови) (ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»);
- биотехнологические лекарственные препараты (БтЛП) лекарственные препараты, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные

клетки млекопитающих), гибридомного метода и метода моноклональных антител (ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты»);

– генотерапевтические лекарственные препараты - лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности.

Биологические лекарственные средства (БЛС) могут содержать, белки, пептиды и/или производные белков и пептидов, гликопротеины; живые или инактивированные микробы (бактерии, вирусы), их антигены, антитела к ним, метаболиты и другие действующие вещества биологического происхождения (например, цитокины, моноклональные антитела, рецепторы клеток, рекомбинантные белки, подобные цитокинам или факторам свертывания из плазмы крови, вакцины на основе рекомбинантных белков и т.п.).

В состав БЛП могут входить вспомогательные вещества различного функционального назначения (стабилизаторы, адъюванты, сорбенты, консерванты, наполнители и др.).

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

адъювант – химическое или биологическое вещество, усиливающее иммунную реакцию на антиген и (или) увеличивающее продолжительность иммунитета;

антигены – вещества (например, токсины, чужеродные белки, бактерии, вирусы, клетки ткани и др.), способные вызвать специфические иммунные реакции;

антитела – белки, синтезированные В-лимфоцитами, которые специфически связываются с антигенами, индуцировавшими их синтез. В зависимости от метода производства выделяют два главных типа антител: моноклональные антитела и поликлональные антитела;

банк клеток – пул однородных клеток, хранящихся порциями в индивидуальных контейнерах в определенных условиях.

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;

вектор – агент трансмиссии (молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК), переносящий генетическую информацию от одной клетки или организма к другой, например плазмиды, вирусы;

вирусный вектор – вектор, произведенный путем модификации вируса с помощью методов молекулярной биологии для удерживания некоторых, но не всех, материнских генов вируса. При удалении генов, ответственных за способность вируса к репликации, созданный вектор является неспособным к репликации;

вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств[1], кроме фармацевтических субстанций и упаковочного материала;

ген – последовательность ДНК, кодирующая один или несколько белков;

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;

исходные материалы – исходные материалы представляют собой любые субстанции биологического происхождения, такие как микроорганизмы, органы и ткани животного происхождения, клетки или жидкости (включая кровь и

плазму) человеческого или животного происхождения, а также биотехнологические клеточные субстраты (рекомбинантные и природные), включая первичные клетки;

клеточный запас – первичные клетки, размножившиеся до заданного количества клеток, разделенные на аликвоты и используемые в качестве исходного материала для производства ограниченного количества серий лекарственных препаратов на основе клеток;

клетки хозяина – клетки микроорганизмов или эукариотических клеточных линий, используемые для получения продукта, до внесения в них вектора;

клеточная культура – клеточная масса, полученная в результате выращивания *in vitro* клеток, изолированных от многоклеточных организмов;

пассаж – перенос микроорганизма из одной питательной среды в другую среду или от одного хозяина (животного, культуры клеток и пр.) другому;

перенос генов – процесс переноса гена в клетки, включая систему экспрессии, содержащуюся в системе доставки, которая называется вектором. Вектор может быть как вирусного, так и невирусного происхождения. После переноса генов генетически модифицированные клетки также могут называться «трансформированные клетки»;

плазмида – часть ДНК, обычно существующая в бактериальной клетке в виде кольцевой структуры, отделенной от клеточной хромосомы. Плазмида может быть модифицирована с помощью методов молекулярной биологии, выделена из бактериальной клетки и использована для переноса и встраивания ее ДНК в геном другой клетки;

производственный штамм - штамм микроорганизмов, который хранится на производстве в определенных условиях и используется для приготовления биологических препаратов;

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;

свободные от специфических патогенов – животные материалы (например, куры, эмбрионы или культуры клеток), использующиеся для производства или контроля качества биологических лекарственных препаратов, полученные из групп животных (например, стад или стай), свободных от определенных патогенов. Такие стада или стаи определяются как группы животных, которые живут в общей среде и имеют ухаживающий за ними персонал, который не пребывает в контакте с животными, несвободными от специфических патогенов;

уровень биологической безопасности –совокупность мероприятий и средств, предотвращающих заражение окружающей среды и персонала при работе с биологическими агентами, определенной группы патогенности (I-IV);

чистая культура (аксеничная культура) – культура, представленная микроорганизмами только одного вида, характеризующимися общими морфологическими, культуральными, антигенными, биохимическими и другими свойствами);

экспрессирующая конструкция – вектор, который содержит кодирующую последовательность рекомбинантного белка и элементы, необходимые для его экспрессии;

штамм-продуцент – комплекс клетки хозяина и вектора.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ

Производство БЛС отличается сложностью и многообразием технологических процессов, т.к. связано с биологическими процессами и материалами, такими как культивирование клеток или экстракция материала из живых организмов. Биологические процессы характеризуются вариабельностью, что приводит к непостоянству спектра и природы сопутствующих продуктов. Более того,

материалы, используемые в процессах культивирования, сами по себе являются субстратами для роста микроорганизмов. Безопасность биологических лекарственных препаратов основывается на строгом контроле их исходных материалов. При оценке рисков контаминации исходного сырья и исходных материалов особое внимание уделяется риску, связанному с контаминацией возбудителями губчатой энцефалопатией животных (ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств») и латентными вирусами (ОФС «Вирусная безопасность»). Также должно быть уделено внимание исходным материалам, непосредственно контактирующим с технологическим оборудованием или продукцией.

Для предотвращения нежелательного изменения свойств, которое может произойти вследствие многократных пересевов или большого числа генераций, производство биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, получаемых из культур микроорганизмов, культур клеток или размножением в эмбрионах, тканях и органах животных, должно быть основано на системе главной и рабочей посевных культур и (или) банков клеток. К некоторым типам высокотехнологичных лекарственных препаратов данная система может быть неприменимой. Количество генераций (удвоений, пассажей) между посевной культурой или банком клеток и биологической фармацевтической субстанцией либо лекарственным препаратом должно соответствовать требованиям спецификаций в регистрационном досье или протоколе клинических исследований. Посевные культуры и банки клеток необходимо создавать, хранить и использовать таким образом, чтобы риск их контаминации или изменения был минимальным (например, хранить в герметичных контейнерах в жидком азоте). Создание систем посевных культур и банков клеток, включая главные и рабочие посевные культуры, должно являться частью управления жизненным циклом БЛС и проводиться в надлежащих условиях.

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 биологических лекарственных препаратов».

Качество БЛС 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 (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты»; ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Вакцины и анатоксины»; ОФС «Пробиотики»; ОФС «Бактериофаги», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»);
- 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) (ОФС «Требования к клеточным культурам-субстратам производства биологических лекарственных препаратов»);
- животные и птицы, куриные эмбрионы, используемые для производства БЛП, 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 (ОФС «Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные»);

- при производстве БЛП из плазмы и клеток крови и органов человека должны соблюдаться требования, предъявляемые к состоянию здоровья донора (ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»);
- БЛП, в состав которых входят донорские ткани или клетки, должны соответствовать требованиям законодательства Российской Федерации в части прослеживаемости, уведомления уполномоченного федерального органа исполнительной власти о неблагоприятных реакциях и клинических случаях в ходе терапии, а также в части технических требований по идентификации, обработке, предохранению, хранению и транспортировке донорских тканей и клеток.

Субстанции, используемые при получении лекарственных препаратов, выпускаемые на разных производствах, должны быть зарегистрированы в установленном порядке.

Производство БЛП должно осуществляться в условиях соблюдения надлежащих требований организации производства и контроля качества лекарственных средств. 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.

При производстве БЛС определенные промежуточные этапы производства, являющиеся критическими стадиями/точками в технологии производства, должны быть указаны и определены соответствующие методы внутрипроизводственного контроля. Все этапы процесса производства должны быть валидированы. Испытания, проводимые в рамках валидации технологического процесса для производства БЛП, должны включать надлежащую оценку, как самого технологического процесса производства в целом, так и каждого его этапа по отдельности; кроме того, необходимо

представить данные, доказывающие, что на любом из своих этапов валидированный технологический процесс способен обеспечить получение лекарственного препарата и промежуточных продуктов воспроизводимого качества (то есть продуктов, качество которых удовлетворяет характеристикам качества и требованиям, установленным в спецификациях на эти продукты).

Контроль БЛП включает в себя, наряду с физико-химическими, химическими методами и биологические, которые характеризуются более высокой степенью вариабельности. Поэтому при производстве биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов ключевую роль играет надежный производственный процесс, и особое значение имеет контроль в процессе производства.

При изменениях производственного процесса, введении нового регламента или способа производства, оказывающих влияние на качество БЛП и/или стабильность и воспроизводимость процесса, представляются доказательства их пригодности для серийного производства, материалы по валидации процесса и сопоставимости продукта.

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтических биологических субстанций регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Пробиотики», ОФС «Бактериофаги», ОФС «Вакцины и анатоксины», ОФС «Аллергены».

Описание. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. Определяется с помощью комплекса методов, позволяющих специфически идентифицировать действующее вещество, произведенное или выделенное из биологического источника с использованием

стандартных образцов. Для подтверждения подлинности могут быть использованы следующие методы: биологический (специфическая активность), микробиологический, иммуноферментный анализ (ОФС «Метод иммуноферментного анализа»), пептидное картирование, капиллярный электрофорез (ОФС «Капиллярный электрофорез»), электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, изоэлектрическое фокусирование (ОФС «Электрофорез», «Электрофорез в полиакриламидном геле», «Изоэлектрическое фокусирование»), определение гликанового профиля и другие валидированные методы.

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Прозрачность раствора, цветность раствора. Испытания обязательны для субстанций, используемых для приготовления парентеральных, глазных, назальных и ушных лекарственных средств. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» и ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Процедура пробоподготовки должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Испытание проводится в случае возможной деструкции действующего вещества, произведенного или выделенного из биологического источника в процессе производства и появления технологических примесей. Требования к чистоте, родственным соединениям и посторонним примесям должны обеспечивать безопасность и эффективность субстанции (ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Вакцины и анатоксины»).

Чистоту субстанции определяют с помощью комплекса методов. Для белковых БЛП испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Остаточные белки клетки-хозяина, остаточная ДНК штамма-продуцента. Испытания обязательны для фармацевтической субстанции, произведенной по технологии рекомбинантной ДНК и предназначенной для реализации. В случае, если используемая для производства фармацевтическая субстанция не предназначена для реализации, испытания проводятся с использованием балка субстанции для хранения, в нормативной документации на лекарственный препарат приводится указание о гарантии качества ЛС по данному показателю.

Микробиологическая чистота. Уровень микробиологической чистоты субстанции должен обеспечивать уровень чистоты лекарственного препарата при его производстве/изготовлении из этой субстанции. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Данное испытание вводят для субстанций, используемых в производстве готовых стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются процедуре стерилизации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Испытания проводят для субстанций, предназначенных для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Субстанции должны выдерживать тест на пирогенность или бактериальные эндотоксины без проведения предварительной стерилизации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины».

В случае если, субстанция не обладает пирогенными свойствами и в

процессе производства не может быть загрязнена пирогенными примесями не бактериальной природы, целесообразно проводить испытание на бактериальные эндотоксины.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безвредность. Испытанию подвергают субстанции, содержащие живые пробиотические бактерии. Определение специфической безвредности пробиотиков проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Химические показатели. Количественное содержание белка, нуклеиновых кислот, полисахаридов и др. должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методы испытаний должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации и проводиться в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Вакцины и анатоксины». Для количественного определения действующего вещества субстанции используют физико-химические и химические методы анализа.

Белок. Содержание белка должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с валидированной методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации на фармацевтическую субстанцию.

Вещества, вносимые в субстанцию. Количественное содержание веществ, используемых в качестве сорбента, адъюванта, консерванта, стабилизатора и др. должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Каждый определяемый

показатель излагают в самостоятельном разделе. Методы определения количественного содержания веществ, вносимых в субстанцию должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Специфическая активность. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Пробиотики», ОФС «Бактериофаги», ОФС «Вакцины и анатоксины», ОФС «Аллергены»).

Транспортирование и хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ИСПЫТАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Показатели качества БЛП («Прозрачность», «Цветность», «Время восстановления препарата» «pH», «Время распадаемости», «Температура и время плавления или время полной деформации», «Извлекаемый объем», «Потеря в массе при высушивании» или «Вода», «Средняя масса и отклонения от средней массы», «Механические включения») лекарственных форм регламентируют согласно требованиям ОФС «Лекарственные формы» и ОФС на соответствующие лекарственные формы» (раствор – ОФС «Растворы»; суспензия – ОФС «Суспензии»; эмульсия – ОФС «Эмульсии»; раствор, суспензия – ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения» и «Глазные лекарственные формы»; порошок - ОФС «Порошки»; таблетка - ОФС «Таблетки»; суппозиторий - ОФС «Суппозитории»; капсула - ОФС «Капсулы»; аэрозоль или спрей - ОФС «Аэрозоли и спреи»; мазь, линимент, гель - ОФС «Мази» и др.).

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.

Описание. Приводится описание свойств лекарственного препарата в конкретной лекарственной форме. Должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. Подтверждают различными методами биологического, микробиологического, иммунобиологического, молекулярного, химического или физико-химического анализа, позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат. Методы должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на БЛП.

Стерильность. БЛП в лекарственных формах для парентерального применения и глазных каплях должны быть стерильными. Испытание проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

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

Отсутствие посторонней микрофлоры. Испытанию подлежат БЛП, содержащие живые микроорганизмы. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в фармакопейной статье или нормативной документации не указан иной метод испытания.

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Определение для парентеральных препаратов проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины». Для препаратов, которые обладают пирогенными свойствами и в процессе производства не могут быть загрязнены пирогенными примесями не бактериальной природы, то следует проводить испытание на бактериальные эндотоксины.

Аномальная токсичность. Испытания аномальной токсичности

парентеральных препаратов проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Определение аномальной токсичности других лекарственных форм описывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Специфическая безопасность. БЛП не должны обладать вирулентными свойствами исходных микробных штаммам, использованных для изготовления препарата.

Неживые инактивированные или субъединичные бактерийные и вирусные препараты не должны содержать жизнеспособных микроорганизмов производственного штамма, анатоксины - необезвреженного токсина и т.д.

БЛП должны соответствовать требованиям специфической безопасности, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на препарат.

Методы определения специфической безопасности описывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Специфическая безвредность. БЛП должны соответствовать требованиям специфической безопасности, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на препарат.

Испытанию подвергают неинъекционные препараты, содержащие живые микробы. Методы должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на БЛП.

Определение специфической безвредности пробиотиков проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Специфическая активность. Испытание проводят с помощью методов количественного определения содержания действующего вещества, которое произведено или выделено из биологического источника (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Пробиотики», ОФС «Бактериофаги», ОФС «Вакцины и анатоксины», ОФС «Аллергены»). Определение

специфической активности должно осуществляться с использованием соответствующих стандартных образцов, откалиброванных по отношению к Международным стандартным образцам (при наличии последних).

Химические показатели. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на БЛП.

Определение показателей для каждого вида БЛП, проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Вакцины и анатоксины», ОФС «Аллергены»

Вещества, вносимые в препарат. Должны соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на БЛП.

Количественное определение проводят в соответствии с (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Вакцины и анатоксины»; ОФС «Аллергены»).

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

Примеси. Определяют вещества, которые могут попасть в БЛП в процессе производства или образоваться в процессе хранения. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методы испытания должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Допустимо определение примесей в процессе производства до внесения

вспомогательных веществ.

Вирусная безопасность. БЛП, полученные из крови, плазмы крови, органов и тканей человека не должны содержать поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусам гепатитов В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

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 (ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты»; ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Вакцины и анатоксины»; ОФС «Пробиотики»; ОФС «Бактериофаги», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»). К паспортным данным штамма, при необходимомсти прилагают дополнительную характеристику.

Контроль качества производственных штаммов микроорганизмов и штаммов для контроля проводится не реже 1 раза в год.

Растворители, выпускаемые в комплекте с лиофилизированным препаратом. Требования к качеству растворителя указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аллергены», и ОФС «Вакцины».

Упаковка, **маркировка**. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Условия транспортирования такие же, как и для хранения. Возможность

транспортирования препарата при другом температурном режиме должна быть обоснована в соответствующем разделе нормативной документации должно содержаться указание о правилах фиксирования продолжительности данного режима транспортирования.

Хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Условия хранения БЛП должны обеспечивать сохранность всех свойств препарата на протяжении регламентированного срока его годности. Температурный режим хранения, как правило, должен находиться в пределах от 2 до 8^0C, если в фармакопейной статье нет других указаний. Адсорбированные на адъювантах препараты не должны подвергаться замораживанию.

Биотехнологические лекарственные препараты

ОФС.1.7.1.0011.18

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на биотехнологические лекарственные препараты. Биотехнологические лекарственные препараты (БтЛП) - лекарственные препараты, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих), гибридомного метода и метода моноклональных антител.

БтЛП могут содержать, белки, пептиды или производные белков и пептидов, гликопротеины; живые или инактивированные микроорганизмы (бактерии, вирусы), их антигены, антитела к ним, метаболиты и другие действующие вещества биологического происхождения (например, пробиотики, бактериофаги, цитокины, моноклональные антитела, рекомбинантные белки и т.п.).

Данная ОФС не распространяется на антибиотики, синтетические пептиды и полипептиды, гепарины, витамины, метаболиты клеток.

В состав БтЛП могут входить вспомогательные вещества различного функционального назначения (стабилизаторы, сорбенты, консерванты, наполнители и др.).

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ

Производство БтЛП 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, гибридомной технологии и др.). Эти биотехнологические процессы характеризуются вариабельностью, что может приводить к непостоянству спектра и природы сопутствующих продуктов. Более того, материалы, используемые в процессах культивирования, сами по себе являются субстратами для роста микроорганизмов. Безопасность биотехнологических лекарственных средств основывается на строгом контроле их исходных материалов. При оценке рисков контаминации исходного сырья и исходных материалов особое внимание уделяется риску связанному с контаминацией возбудителями губчатой энцефалопатии животных (ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств») и латентными вирусами (ОФС «Вирусная безопасность»). Также должно быть уделено внимание исходным материалам, непосредственно контактирующим с технологическим оборудованием или продукцией (таким как питательные среды, используемые для симуляции асептического розлива, и смазочные материалы, которые могут контактировать с продуктом).

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 биологических лекарственных препаратов». Для предотвращения нежелательного изменения свойств, которое может произойти вследствие многократных пересевов или большого числа генераций, производство биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, получаемых из культур микроорганизмов, культур клеток или размножением в эмбрионах, тканях и органах животных, должно быть основано на системе главной и рабочей посевных культур и (или) банков клеток. Такая система

может быть неприменимой ко всем типам биотехнологических лекарственных препаратов.

Качество БтЛП обеспечивается соблюдением основных условий:

- в производстве используют только изученные, генетически стабильные производственные штаммы микробов, штаммы-продуценты охарактеризованные и депонированные в официальных коллекциях, ежегодно контролируемые по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями; при этом на основе материалов по изучению генетической стабильности производственного штамма, ограничивают число пассажей микроба (ОФС «Пробиотики»; ОФС «Бактериофаги», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»);
- 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) (ОФС «Требования к клеточным культурам-субстратам производства биологических лекарственных препаратов»).

Субстанции, используемые при получении лекарственных препаратов, выпускаемые на разных производствах, должны быть зарегистрированы в установленном порядке.

Производство БтЛП должно осуществляться в условиях соблюдения надлежащих требований организации производства и контроля качества лекарственных средств. При производстве и/или испытании препарата с использованием микроорганизмов I-II или III-IV группы патогенности работу

проводят при соблюдении соответствующих санитарно-эпидемиологических правил.

При производстве БтЛС определенные промежуточные этапы производства, являющиеся критическими стадиями/точками в технологии производства, должны быть указаны и определены соответствующие методы внутрипроизводственного контроля. Для биотехнологических материалов, которые не могут быть простерилизованы, производство должно проводиться в асептических условиях для минимизации риска внесения контаминантов. Все этапы процесса производства должны быть валидированы. Испытания, проводимые в рамках валидации технологического процесса для производства БтЛП, должны включать надлежащую оценку, как самого технологического процесса производства, так и каждого его этапа по отдельности (например, этапа культивирования клеток, этапа сбора клеток, выросших в культуре, этапов очистки, смешивания, стерилизации, наполнения и т.п.). Кроме того, необходимо наличие данных, подтверждающих, что на любом из своих этапов валидированный технологический процесс способен обеспечить получение лекарственного препарата и промежуточных продуктов воспроизводимого качества, то есть продуктов, качество которых удовлетворяет характеристикам качества и требованиям, установленным в спецификациях на эти продукты.

Производство БтЛП 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 БтЛП и/или стабильность и воспроизводимость процесса, представляются доказательства их пригодности для серийного производства и материалы по валидации процесса и сопоставимости продукта.

Контроль БтЛП включает в себя, наряду с физико-химическими и иммунохимическими методами биологические, которые характеризуются более высокой степенью вариабельности.

БтЛП выпускают в различных лекарственных формах: лиофилизаты, порошки, растворы, суспензии, таблетки, капсулы, гранулы, суппозитории, мази, спреи и др. Лиофилизаты 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 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтических биотехнологических субстанций регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Пробиотики», ОФС «Бактериофаги».

Требования к качеству фармацевтической субстанции и методы для нижеперечисленных испытаний изложены в ОФС «Биологические лекарственные препараты» и ОФС ««Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», в разделе «Испытания фармацевтической субстанции»: Описание. Подлинность. Прозрачность раствора, цветность раствора. pH. Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Остаточные белки клетки-хозяина, Остаточная ДНК штамма-продуцента. Стерильность. Микробиологическая чистота. Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Аномальная токсичность. Химические показатели. Вещества, вносимые в препарат. Специфическая активность. Транспортирование и хранение.

ИСПЫТАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

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 качеству БтЛП и методы для проведения нижеперечисленных испытаний изложены в ОФС «Биологические лекарственные препараты» в разделе «Испытания биологического лекарственного препарата»: Описание. Подлинность. Стерильность. Микробиологическая чистота. Отсутствие посторонней микрофлоры. Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Аномальная токсичность. Специфическая активность. Химические показатели. Вещества, вносимые в препарат. Производственные штаммы микроорганизмов и штаммы для контроля. Растворители, выпускаемые в комплекте с лиофилизированным препаратом. Упаковка и маркировка. Транспортирование и хранение.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Требования к чистоте, родственным соединениям и посторонним примесям должны обеспечивать безопасность и эффективность БтЛП (ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»). Определяют допустимое содержание примесей и родственных соединений в БтЛП (единице объема или массы) веществ или образующихся в процессе хранения.

Чистота препарата оценивают с помощью комплекса методов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Определяют содержание белка и ДНК клеток-продуцентов в БтЛП, полученных методом генной инженерии. Содержание белка и ДНК клеток-продуцентов в БтЛП не должно превышать показателей, определенных международными требованиями.

Показатели качества БтЛП («Прозрачность», «Цветность», «Время восстановления препарата» «pH», «Время распадаемости», «Температура и

время плавления или время полной деформации», «Извлекаемый объем», «Потеря в массе при высушивании» или «Вода», «Средняя масса и отклонения от средней массы», «Механические включения», «Осмолярность») лекарственных форм регламентируют согласно требованиям ОФС «Лекарственные формы» и ОФС на соответствующие лекарственные формы (раствор – ОФС «Растворы»; суспензия – ОФС «Суспензии»; эмульсия – ОФС «Эмульсии»; раствор, суспензия – ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения» и «Глазные лекарственные формы»; порошок - ОФС «Порошки»; таблетка - ОФС «Таблетки»; суппозиторий - ОФС «Суппозитории»; капсула - ОФС «Капсулы»; аэрозоль или спрей - ОФС «Аэрозоли и спреи»; мазь, линимент, гель - ОФС «Мази» и др.).

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Биологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Биологические лекарственные препараты.

Интерфероны **ОФС.1.7.1.0012.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на интерфероны, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК с применением в качестве экспрессионной системы бактериальных клеток или клеток млекопитающих.

Интерфероны (ИФН) относятся к группе цитокинов и представляют собой глобулярные белки, которые являются полифункциональными биорегуляторами широкого спектра действия.

Основные биологические свойства интерферонов проявляются в их противовирусном, антипролиферативном и иммуномодулирующем действии.

По происхождению различают три типа интерферонов: ИФНα – лейкоцитарный (продуцируется лейкоцитами, плазмоцитоидными дендритными клетками, моноцитами/макрофагами), ИФНβ – фибробластный (продуцируется фибробластами и эпителиальными клетками), ИФНγ – иммунный (продуцируется Т-лимфоцитов и натуральными киллерами,).

По способу получения ИФН делятся на природные (ИФН первого поколения) и рекомбинантные, полученные с помощью генно-инженерной технологии (ИФН второго поколения).

Природный интерферон человеческий лейкоцитарный представляет собой группу белков (интерфероны альфа-типа), синтезируемых лейкоцитами, полученными из крови клинически здоровых доноров в ответ на воздействие вируса–индуктора интерферона (вирус болезни Ньюкасла или вирус Сендай).

Требования к производству и оценке качества препаратов этого типа описаны в ФС «Интерферон человеческий лейкоцитарный».

Требования, приведенные в настоящей фармакопейной статье, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

Данная статья не распространяется на модифицированные (пегилированные) интерфероны.

Интерфероны альфа (ИФНα)

Аминокислотная последовательность

CDLPQTHSLG SRRTLMLLAQ MRRISLFSCL KDRHDFGFPQ EEFGNQFQKA ETIPVLHEMI QQIFNLFSTK DSSAAWDETL LDKFYTELYQ QLNDLEACVI QGVGVTETPL MKEDSILAVR KYFQRITLYL KEKKYSPCAW EVVRAEIMRS FSLTSNLQES LRSKE

Эмпирическая формула: $C_{860}H_{1349}N_{227}O_{255}S_9$.

Рекомбинантные ИФНα представляют собой негликозилированные белки, состоящие из 165 аминокислот и содержащие две дисульфидные связи: между остатками цистеина в 1-м и 98-м положениях и в 29-м и 138-м положениях. Молекулярная масса негликозилированного белка составляет около 19300 Да. Продуцентом ИФНα являются генетически модифицированные клетки Esherichia coli, полученные путем трансформации исходного штамма вектором, содержащим ген ИФНα человека. В структуре молекулы, образующейся при синтезе рекомбинантного белка рибосомой бактериальной клетки, имеется N-концевой метионин в отличие от эндогенного интерферона, который N-концевым аминокислотным остатком содержит цистеин, связанный дисульфидной связью с 98 цистеином белка. Подсемейства ИФНα 2a и 2b различаются аминокислотами в положениях 23: лизин и аргинин, соответственно.

Интерфероны бета (ИФНβ)

Интерферон бета-1а

Аминокислотная последовательность

MSYNLLGFLQ RSSNFQCQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQQF QKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT VLEEKLEKED FTRGKLMSSL HLKRYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI LRNFYFINRL TGYLRN

Эмпирическая формула: $C_{908}H_{1406}N_{246}O_{252}S_7$

Интерферон бета-1а идентичен эндогенному ИФН человека, представляет собой гликозилированный белок, состоящий из 166 аминокислотных остатков с одной внутрицепочечной дисульфидной связью, имеющий один сайт N-гликозилирования по аспарагиновому остатку в позиции 80 и цистеин в позиции 17. Молекулярная масса 22 500 Да. Известны 6 гликоформ ИФНβ-1а, обусловленных дифференциальным гликозилированием сайта и отличающихся количеством олигосахаридов и степенью их сиалирования. Продуцент ИФНβ-1а – генетически модифицированная культура клеток яичника китайского хомячка (CHO).

Интерферон бета-1b

Аминокислотная последовательность

SYNLLGFLQR SSNFQSQKLL WQLNGRLEYC LKDRMNFDIP EEIKQLQQFQ KEDAALTIYE MLQNIFAIFR QDSSSTGWNE TIVENLLANV YHQINHLKTV LEEKLEKEDF TRGKLMSSLH LKRYYGRILH YLKAKEYSHC AWTIVRVELL RNFYFINRLT GYLRN

Эмпирическая формула: $C_{903}H_{1399}N_{245}O_{252}S_5$

Интерферон бета-1b модифицирован по отношению к природному, представляет собой негликозилированный белок, состоящий из 166 аминокислотных остатков той же последовательности, за исключением позиции 17 – серин. Не содержит N-концевого метионина. Молекулярная масса

18000-20000 Да. Продуцент рекомбинантного ИФНβ-lb - клетки Escherichia coli, в геном которых внедрен ген человеческого ИФНβ.

Интерферон-гамма (ИФНγ)

*Интерферон-гамма (ИФНγ) п*редставляет собой белок, молекула которого состоит из нековалентно связанного димера двух одинаковых мономеров. Состоит из 140 аминокислотных остатков и содержит N-концевой метионин. Молекулярная масса 16 495 Да. Отличается от нативного белка делецией 10 аминокислотных остатков на С-конце молекулы и заменой кластера KRKR на KGSA. Метод получения – рекомбинантная технология.

Эмпирическая формула ИФНγ-1b: $C_{734}H_{1166}N_{204}O_{216}S_5$

ПРОИЗВОДСТВО

Производство ИФН осуществляется с применением технологии рекомбинантной ДНК и должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики.

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, производство лекарственного средства, включая банки штаммов-продуцентов, должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

В качестве клеток-хозяина для создания штамма-продуцента ИФН используются бактериальные клетки или клетки млекопитающих. Производство основано на системе банков клеток-продуцентов - Главного банка клеток (ГБК) и Рабочего банка клеток (РБК).

Используемые в процессе производства ИФН клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратах» и ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

ИСПЫТАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтической субстанции регламентируются нижеприведёнными показателями, требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Описание. Должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается с помощью комплекса методов, позволяющих специфически идентифицировать ИФН с использованием стандартных образцов. Подлинность ИФН должна быть подтверждена биологическими методами по оценке специфической противовирусной активности, в реакции нейтрализации противовирусной активности ИФН моно- или поликлональными антителами против соответствующего типа ИФН, в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферонов с использованием культур клеток» и/или методом иммуноферментного анализа, а также на уровне структуры белка и его пострансляционных модификаций с применением физико-химических методов исследования: пептидным картированием, карбогидратным картированием (для гликозилированных белков), электрофорезом в полиакриламидном геле, изоэлектрическим фокусированием, обращено-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией, методом масс-спектрометрического анализа и др.

Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Для испытаний могут использоваться методы в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и

чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и другие валидированные методики, указанные в нормативной документации.

Прозрачность. Должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси.

Чистота субстанции оценивается комплексом обоснованных (не менее 2-3) взаимодополняющих методов, позволяющих охарактеризовать содержание остаточных количеств восстановленной формы ИФН, димеров и агрегатов, продуктов деградации (окисленные и дезамидированные формы).

Содержание родственных соединений и посторонних примесей в субстанции оценивают обоснованными методами. Нормативные требования и методика испытаний должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Остаточные белки клетки-хозяина. Содержание белков штамма-продуцента должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Остаточные белки клетки-хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или ИФА). Методика должна быть указана в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Остаточная ДНК штамма-продуцента. Содержание остаточных белков клеток-хозяина и ДНК штамма-продуцента не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации, и не превышать показателей, определенных международными требованиями.

Определение проводят методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином или другой меткой. Возможно использования готовых наборов реагентов, с применением валидированной методики.

Микробиологическая чистота. Должна соответствовать требованиям, предъявляемым к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной, если хранится после стерилизующей фильтрации. Испытания стерильности проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Указывают допустимое содержание бактериальных эндотоксинов и метод определения. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Пирогенность (если применимо). Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если нет других указаний в нормативной документации.

Белок. Содержание белка должно соответствовать нормам, определенным фармакопейной статьей или нормативной документацией на субстанцию. Испытания проводят любым пригодным методом, например, в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС

«Хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», ОФС «Определение белка» или в соответствии с валидированной методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации на фармацевтическую субстанцию. Выбор метода определения белка должен быть обоснован.

Специфическая активность. Субстанция должна обладать противовирусной активностью и выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Количественное определение активности ИФН проводят с использованием биологического метода *in vitro* на соответствующей линии клеток, чувствительных к ИФН в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток».

Методика испытания должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации.

Удельная активность. Величина показателя должна соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Определяют расчетным методом как частное от деления величины специфической активности (МЕ/мл) на величину содержания белка (мг/мл).

Транспортирование, хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных ИФН выпускают в различных формах: капли назальные, капли глазные, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь, лиофилизат в капсулах, раствор для инъекций, суппозитории, мази, гели.

Форма выпуска препарата определяет перечень показателей качества и методы их определения.

Препараты ИФН для парентерального введения широко используются в практике здравоохранения для лечения многих тяжелых вирусных заболеваний, в том числе вирусных гепатитов B, C, D, рассеянного склероза, а также большого круга онкологических заболеваний.

Препараты для местного применения (мази, суппозитории, капли и т.д.) при ряде нозологических форм способны обеспечить накопление больших концентраций препарата непосредственно в очаге поражения при отсутствии побочных эффектов, свойственных парентеральному введению высоких доз интерферона. За счет высокой концентрации в очаге инфекции достигается выраженный местный противовирусный и иммуностимулирующей эффект. Системное всасывание препаратов незначительное.

Низкая биодоступность лекарственных средств при интраназальном введении связана с функционированием особого семейства белков из 25 протеинов, входящих в состав слизистой оболочки полости носа и контролирующих транспорт всех молекулярных и клеточных объектов, проникающих через слизистую.

Лекарственные формы препаратов ИФН для ректального применения эффективны для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта, а также в составе комплексной терапии для лечения других инфекционных заболеваний вирусной этиологии. Эти препараты оказывают местное и системное действие, их биодоступность составляет более 80%. При ректальном введении отсутствуют побочные эффекты, возникающие при парентеральном введении препаратов ИФН, не образуются антитела, нейтрализующие противовирусную активность.

Препараты для местного применения и ректального применения в большинстве своем являются комбинированными и, в зависимости от состава препарата, нормативная документация должна содержать показатели,

характеризующие «Подлинность» и «Количественное содержание» всех основных действующих веществ.

Требования к испытаниям лекарственных препаратов ИФН регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС на соответствующую лекарственную форму (ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Аэрозоли и спреи», ОФС «Глазные лекарственные формы», ОФС «Мази» и др.).

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы препарата соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. Подлинность подтверждается комплексом (2-3) взаимодополняющих методов (один из которых – определение специфической активности), позволяющих специфически идентифицировать ИФН с использованием стандартных образцов. Подлинность ИФН может быть подтверждена биологическим методом в реакции нейтрализации противовирусной активности ИФН моно- или поликлональными антителами против соответствующего типа ИФН (ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток»), а также следующими физико-химическими методами: изоэлектрическим фокусированием, обращено-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией и другими методами с доказанной специфичностью.

Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат. Для испытаний могут использоваться методы в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного

анализа» и другие валидированные методики, указанные в нормативной документации.

Время восстановления препарата. (для лиофилизированных форм). Время восстановления лекарственного препарата указывается в фармакопейной статье или нормативной документации. Условия проведения испытания и методы должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Прозрачность. Должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Лекарственный препарат должен соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем (для парентеральных форм). Извлекаемый объем должен быть не менее номинального и должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье и нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Герметичность (если применимо). Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Методика испытания должна быть приведена в нормативной документации.

Осмолярность (Осмоляльность) (если применимо). Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Примечание

При необходимости показатель «Осмолярность» может быть заменен на показатель «Осмоляльность» с приведением обоснования замены.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Испытания проводят в соответствии с указанными ОФС.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси (если применимо). Определение проводится комплексом взаимодополняющих методов (не менее 2-3), выбор которых должен быть обоснован. Требования по содержанию родственных соединений и посторонних примесей должны гарантировать безопасность и эффективность лекарственного препарата.

Содержание родственных соединений, и посторонних примесей может определяться с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; изоэлектрофокусирования; обращено-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии и других методов с доказанной специфичностью и точностью.

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

Методики испытания должны быть приведены в нормативной документации на лекарственный препарат.

Стерильность. Лекарственный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации. В нормативной документации должно

быть указание о наличии/ отсутствии антимикробного действия препарата в условиях проведения испытания. В случае проведения испытания методом прямого посева должны быть указаны питательные среды для проведения испытаний, соотношение количества испытуемого препарата и питательной среды, условия инкубации. Для метода мембранной фильтрации при необходимости должна быть приведена методика пробоподготовки препарата к испытанию, с указанием промывочной жидкости и количества промывок мембранного фильтра.

Бактериальные эндотоксины. Указывают допустимое содержание бактериальных эндотоксинов и методы определения. Содержание должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на препарат. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Лекарственный препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Белок. Содержание белка не должно превышать значений, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с другой валидированной методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации. Выбор метода определения белка должен быть обоснован.

Вещества, вносимые в препарат. Определяют количественное содержание веществ, используемых в качестве стабилизатора.

Полисорбаты. Определение проводится для препаратов ИФН, в состав которых входят соединения указанного класса. Содержание полисорбата должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание полисорбата может быть определено методами обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрический метод или иной метод с доказанной специфичностью и точностью.

Методика определения, параметры пригодности системы и нормы содержания определяются типом полисорбата, входящего в состав ИФН, и используемым методом испытания.

Выбор метода определения полисорбата должен быть обоснован. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Специфическая активность. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Количественное определение активности ИФН проводят с использованием биологического метода *in vitro* на соответствующей линии клеток, чувствительных к интерферону, в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток», если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иное.

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС для соответствующей лекарственной формы препарата (ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и др.).

Транспортирование, хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, не допускается замораживание в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Контролируемые условия указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

ДНК вакцины **ОФС.1.7.1.0013.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования к ДНК вакцинам.

ДНК вакцины – представляют собой препараты, активным веществом которых являются очищенные рекомбинантные векторы - плазмидные/вирусные, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, содержащие одну или более ДНК последовательностей, способных индуцировать и/или активировать иммунный ответ на патоген или неинфекционное заболевание. Обычно эти плазмидные/вирусные векторы содержат последовательности ДНК, необходимые для отбора и репликации в клетках бактериях или млекопитающих. В дополнение они содержат эукариотический промотор, энхансер и последовательность для терминации/-полиаденилирования транскрипции для активации экспрессиии гена в реципиентах вакцины, а также могут содержать иммуномодулирующие элементы. ДНК-вакцины могут представлять собой бактериальные клетки с рекомбинантной плазмидой или один вектор, как правило – вирусный вектор.

Биологические фармацевтические субстанции указанных препаратов получают с помощью культур охарактеризованных клеток, которыми могут быть бактерии, клетки млекопитающих (в этом случае их называют субстратом) и др. Требования к конкретной биологической фармацевтической субстанции и лекарственным препаратам на их основе должны быть изложены в соответству-

ющих фармакопейных статьях или нормативной документации.

Должно быть доказано, что ДНК-вакцины обладают специфической активностью и безопасностью для человека, а их производство характеризуется постоянством.

Требования, приведенные в настоящей фармакопейной статье, могут быть дополнены или изменены в конкретной фармакопейной статье или нормативной документации с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства. Необходимость замены или использования дополнительных требований для конкретного лекарственного средства должна быть обоснована. Общая фармакопейная статья не распространяется на вакцины на основе живого вирусного вектора и на препараты для генной терапии.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Субстанция ДНК вакцин - это биологические лекарственные средства, представляющие собой бактериальные клетки с плазмидой или один вектор, как правило – вирусный вектор.

Рекомбинантный вектор – агент трансмиссии (молекулярно-генетическая конструкция; молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК), переносящий генетическую информацию от клетки одного вида другому, например плазмиды, вирусы.

Плазмида – внехромосомный фактор наследственности бактерий, кольцевая молекула ДНК, которая обладает способностью стабильно существовать в автономном (не связанном с хромосомой) состоянии в цитоплазме.

Плазмидный вектор – бактериальная плазмида, используемая для переноса гена или генов чужеродной ДНК в клетку хозяина (бактерию) и обеспечивающая размножение чужеродных генов в этих клетках.

Вирусный вектор – вектор, произведенный путем модификации вируса с помощью методов молекулярной биологии для удаления определенных и удерживания некоторых, но не всех, материнских генов вируса. При удалении генов, ответственных за способность вируса к репликации, созданный вектор

является неспособным к репликации.

Посевной материал - это клетки, прошедшие, по крайней мере, такое же количество пассажей или меньше, что и клетки, использованные для производства препарата, пошедшего на клинические испытания.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ

Производство ДНК-вакцин должно соответствовать требованиям «ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные средства». Оно должно быть основано на системе серий посевного материала и системе банков клеток для клеточного субстрата (Главный банк клеток (ГБК) и Рабочий банк клеток (РБК) согласно с ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам – производства биологических лекарственных препаратов» и разделу данной ОФС «Бактериальные клетки, используемые в производстве плазмидных векторов»).

Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы и соответствовать требованиям микробиологической и вирусной безопасности по ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам – производства биологических лекарственных препаратов», ОФС «Вирусная безопасность». Должна быть проведена оценка риска продукта в отношении трансмиссивных губчатых энцефалопатий согласно ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств», для минимизации риска должны быть предприняты соответствующие меры.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ

Все данные по конструированию вектора, включая происхождение вектора, последующие манипуляции с ним, в частности, удаление или модификацию участков вектора должны документироваться. Если применимо, должна быть описана очистка рекомбинатного вектора.

Оценка экспрессирующей конструкции (плазмидный или вирусный вектор) должна быть проведена в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» с учетом особенностей ДНК-вакцин. Должны быть указаны все установленные и непредвиденные рамки считывания. Методы, используемые для подтверждения включения гена в вектор или вектора в клетку хозяина, включают использование рестриктазного картирования, полимеразной цепной реакции, секвенирования полной последовательности ДНК, последнее является предпочтительным.

Допустимое количество пассажей вектора в готовом продукте или пересевов из главного посевного материала не должно превышать количества пассажей или пересевов, использованных для препаратов, эффективность и безопасность которых были установлены в клинических исследованиях.

Если в ДНК вакцине используется больше одного вектора, каждый вектор должен быть охарактеризован, как указано выше.

Все манипуляции с банками клеток и полученными культурами клеток должны проводиться в зоне, свободной от одновременной работы с другими клетками или векторами.

Бактериальные клетки, используемые в производстве плазмидных векторов

Получение плазмидных векторов основано на использовании системы банка бактериальных клеток, с получением и характеристикой главного банка клеток, рабочего банка клеток и посевного материала. Анализ проводится один раз для проверки каждого нового РБК, за исключением чистоты, которая проверяется при каждой ферментации. РБК получают путем культивирования клеток из одной или более ампул ГБК. Регистрируются методики и реактивы, использованные для получения банка, и условия хранения. ГБК и РБК должны иметь четко документированную историю их получения. Главные и рабочие банки клеток контролируются путем проведения испытаний на аликвоте хранящегося в банке материала или полученного путем субкультивирования банка клеток. В таблице приведены испытания, обязательные для проведения на

определенных этапах производства.

Таблица Обязательные испытания бактериальных клеток, используемых в производстве плазмидных векторов на разных этапах производства

Количественное определение	Клетка-хозяин	Главный банк клеток	Рабочий банк клеток	Посевной клеточный материал*
Подлинность и чистота				
Жизнеспособные клетки	+	+	+	+
Характеристики линии бактериальных клеток	+	+	-	+
Генотипирование/ фенотипирование	+	+	-	+
Наличие плазмиды				
Последовательность ДНК плазмиды	-	+	-	+
Количество копий	-	+	+	+
Рестрикционная карта	-	+	+	+
% клеток, содержащих плазмиды	+	+	+	+
Посторонние агенты				
Посторонняя микрофлора	+	+	+	+
Присутствие бактериофагов	+	+	-	+

Испытания на подлинность и чистоту

Жизнеспособность клеток. Количество жизнеспособных клеток определяется методом серийных разведений аликвоты бактериальных клеток с высевом на адекватную плотную питательную среду (метод Коха) и подсчетом отдельных колоний.

Биологическая и биохимическая характеристики бактериального штамма. В зависимости от используемого в производстве штамма бактерий, проводится соответствующее определение биологических и биохимических свойств штамма для подтверждения его принадлежности к определенному виду.

Генотипированние/фенотипирование. Генотип бактериальных клеток верифицируется на основании определения признанных фенотипических маркеров или соответствующего генетического анализа.

Испытания на наличие плазмиды

Последовательность ДНК. Подтверждается полная нуклеотидная последовательность плазмиды.

Количество копий. Плазмидная ДНК выделяется и очищается из определенного количества бактерий, количество копий определяется с помощью пригодного для этого метода количественного ПЦР.

Рестрикционная карта. Рестриктазный анализ проводится с достаточным разрешением, позволяющим подтвердить, что структура плазмиды, находящаяся в бактериальной клетке, не повреждена.

Процент клеток, содержащих плазмиду. Селективные генетические маркеры плазмиды используются для определения процентного количества бактерий, содержащих плазмиду.

Испытания на посторонние агенты и бактериофаги

Посторонняя микрофлора. Посторонняя микрофлора должна отсутствовать. Испытуемый штамм высевают на соответствующую питательную среду методом штрихового посева и термостатируют в условиях, необходимых для обнаружения возможных бактериальных посторонних агентов. Для определения возможности ингибирования роста посторонних микроорганизмов лекарственным средством проводятся испытания в присутствии определенного количества контрольных бактерий, (положительный контроль) (ОФС «Микробиологическая чистота»).

Наличие бактериофагов. Для выявления бактериофагов бактериальные клетки высевают на питательную среду, обеспечивающую рост и размножение бактериофагов и термостатируют при необходимой температуре в питательной среде, обеспечивающей рост и размножение бактериофагов. Пригодность испытания подтверждается путем использования референтной линии бактериофагов и чувствительных тест-штаммов бактерий. Посторонняя микрофлора и бактериофаги должны отсутствовать.

Все изменения технологического процесса после проведения доклинических, клинических исследований должны быть указаны в нормативной доку-

ментации.

ИСПЫТАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Биологическую фармацевтическую субстанцию или конечный балк биологической фармацевтической субстанции для хранения, если препарат производится в непрерывном цикле (далее – субстанция или конечный балк) готовят из одной или нескольких партий очищенных векторов (плазмид, вирусов). В процессе приготовления субстанции или конечного балка могут быть внесены стабилизирующие агенты и другие вспомогательные вещества.

Для производства серии готового препарата может быть использована субстанция или конечный балк, удовлетворяющие требованиям спецификации на субстанцию или установленным для конечного балка (внутренняя спецификация). Если после добавления стабилизирующих агентов и вспомогательных веществ какой-либо показатель не может быть определен, его контроль должен проводиться на очищенном рекомбинантным векторе. Если балк и конечный продукт представляют собой один и тот же материал, испытания балка не требуются. При испытаниях балка должны использоваться стандартные методы с адекватной специфичностью и чувствительностью. Должен использоваться стандартный (референтный) образец для установления критериев пригодности методики (доказательства правильности и воспроизводимости методики). Должна быть оценена стабильность балка/конечного продукта.

Если субстанция представляет собой бактериальные генетически модифицированные клетки, проводят испытания, как указано в разделе «Бактериальные клетки, используемые в производстве плазмидных векторов»

Если субстанция представляет собой очищенный рекомбинантный вектор, необходимы следующие испытания:

Описание Должно быть приведено описание субстанции

Концентрация вектора (плазмиды, вируса). Должна быть указана концентрация ДНК. Концентрация ДНК выше 500 нг/мл может быть определена

спектрофотометрическим методом путем измерения величины поглощения при 260 нм. Величина поглощения раствора двойной кольцевой ДНК в концентрации 50 мкг/мл составляет 1 (удельное поглощение 200). Содержание ДНК в концентрации менее 500 нг/мл определяется после инкубирования с флуоресцентным красителем, который избирательно связывается с двойной кольцевой ДНК и использованием стандартного образца ДНК для построения калибровочной кривой. Для определения плазмидной ДНК также может быть использована жидкостная хроматография с применением стандартного образца. В некоторых случаях используется капиллярный электрофорез.

Должно быть указано допустимое содержание плазмиды в суперскрученной конформации (предпочтительно – более 80 %). Для количественного определения суперскрученных форм может быть использована высокоэффективная анионообменная жидкостная хроматография или капиллярный электрофорез. Капиллярный электрофорез также пригоден для количественного определения других форм. Для вирусного вектора должна быть указана концентрация инфекционных частиц. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и «Капиллярный электрофорез».

Подлинность. Испытания проводят с использованием стандартных образцов с помощью: рестриктазного анализа (если его возможности позволяют выявить возможные критические модификации в плазмиде и подтвердить ее подлинность), полимеразной цепной реакции, секвенированием нуклеотидной последовательности плазмиды/вектора. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован и указан в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или при установлении требований к конечному балку. Если на одной производственной площадке производят различные ДНК вакцины, метод оценки подлинности должен быть способен однозначно идентифицировать каждую производимую плазмиду/вектор в присутствии остальных.

Специфическая активность. Оценивается эффективность трансфекции *in vitro* по транскрипции/трансляции кодируемых генов или in vivo по иммуно-

генности и/или другой целевой биологической активности. По возможности должны быть представлены доказательства того, что выбранный метод коррелирует с иммуногенностью или целевой (протективной) активностью в клинических исследованиях. Для этих целей требуется хорошо охарактеризованный репрезентативный стандартный образец. Обычно используют трансфекцию соответствующей линии клеток *in vitro*, с последующим измерением экспрессированного генетического материала по какой-либо функции, вместо оценки уровня экспрессии самого генетического материала. Может потребоваться проведение дополнительного определения активности с помощью метода вестерн-блот или твердофазного иммуноферментного анализа для оценки целостности и количества экспрессированного продукта. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот» и ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Микробиологическая чистота. Должны быть предусмотрены требования и испытания микробиологической чистоты субстанции (конечного балка) до стерилизующей фильтрации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция (конечный балк) должны быть стерильными, если хранятся после стерилизующей фильтрации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Оценивается по наличию/отсутствию пирогенных веществ. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или установленным требованиям на конкретный препарат, но не более 40 EU на 1 мг плазмиды. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Чистота. Проводится оценка посторонних примесей на стадии получения очищенной плазмиды, если анализ не может быть выполнен в субстанции (ко-

нечном балке).

Методы испытаний указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Выбор методов должен быть обоснован.

Тесты для определения содержания белков и ДНК/РНК клеток-хозяина, а также иных посторонних примесей, связанных с процессом производства (бычий сывороточный альбумин, трансферин, инсулин, белок А, моноклональные антитела и другие примеси) проводятся на достаточном количестве партий очищенной плазмиды или серий субстанции (конечного балка) (не менее 5). Субстанция (конечный балк) должны выдерживать испытания на содержание остаточной ДНК (в расчете не более 10 нг на дозу) и белков штаммов-продуцентов (не более 1 % от содержания плазмиды) в соответствии с требованиями указанными в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию или указаниями требований к конечному балку. Должен быть указан способ расчета данных примесей в лекарственном препарате.

Остаточные белки клетки хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим, иммунохимическим).

Для определения остаточных белков штамма-продуцента возможно использование готовых наборов реагентов, качество которых должно быть подтверждено материалами валидации методики.

Остаточная ДНК клеток хозяина может быть определена методом молекулярной гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином или другой меткой, или методом ПЦР с охарактеризованным пределом обнаружения.

Для оценки посторонних примесей могут использоваться наборы реагентов после валидации методики.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Испытание обязательно для фармацевтической субстанции, произведенной для реализации с целью введения в государственный реестр лекарственных средств и предназначенной для производства биологических лекарственных препаратов (БЛП) для

парентерального применения. Испытания 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.

Транспортирование и хранение. Контролируемые условия, обоснованные исследованиями по стабильности субстанции (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 в соответствии с ОФС «Фармацевтические субстанции» и ОФС «Хранение лекарственных средств».

ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Методики, используемые для проведения испытаний, должны быть описаны максимально подробно с указанием квалификации реактивов, реагентов, лабораторного оборудования, приборов, требований к животным, штаммам микробов, культур клеток и т.д.

Показатели качества ДНК вакцин («Прозрачность», «Цветность», «Время восстановления препарата» «pH», «Извлекаемый объем», «Потеря в массе при высушивании» или «Вода», «Механические включения») лекарственных форм регламентируют согласно требованиям ОФС «Лекарственные формы» и ОФС на соответствующие лекарственные формы» (раствор – ОФС «Растворы»; раствор, суспензия – ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения».

Описание. Лекарственные препараты в жидкой или восстановленной лиофилизированной лекарственной форме – прозрачные или слегка опалесцирующие бесцветные или с желтоватым оттенком растворы без видимых частиц, если нет других

Подлинность. Подтверждается с использованием стандартных образцов с помощью рестриктазного анализа (если его возможности позволяют выявить

возможные критические модификации в плазмиде и подтвердить ее подлинность), полимеразной цепной реакции, секвенированием нуклеотидной последовательности плазмиды/вектора. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован и указан в фармакопейной статье или нормативной документации на препарат. Если на одной производственной площадке производят различные ДНК вакцины, метод оценки подлинности должен быть способен однозначно идентифицировать каждую производимую плазмиду/вектор в присутствии остальных.

Концентрация вектора, его форма. Концентрация ДНК должна быть выше 500 нг/мл и может быть определена путем измерения величины поглощения при длине волны 260 нм. Величина поглощения раствора двойной кольцевой ДНК в концентрации 50 мкг/мл составляет 1 (удельное поглощение 200).

Содержание ДНК в концентрации менее 500 нг/мл определяется после инкубирования с флуоресцентным красителем, который избирательно связывается с двойной кольцевой ДНК и использованием стандартного образца ДНК для построения калибровочного графика. Для определения плазмидной ДНК также может быть использована жидкостная хроматография с применением стандартного образца. В некоторых случаях используется капиллярный электрофорез.

Должно быть указано допустимое количественное содержание плазмиды в суперскрученной конформации. Для количественного определения суперскрученных форм может быть использована высокоэффективная анионообменная жидкостная хроматография или капиллярный электрофорез. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и «Капиллярный электрофорез».

Капиллярный электрофорез также пригоден для количественного определения других форм. Для вирусного вектора должна быть указана концентрация инфекционных частиц. Могут быть использованы иные критерии, если представлены доказательства того, что они позволяют предсказать иммуногенность или другую биологическую активность.

Чистота. Посторонние примеси оценивают на стадии получения субстанции. В случае, если используемая для производства фармацевтическая субстанция не предназначена для реализации и включения в государственный реестр лекарственных средств РФ, испытания проводятся с использованием балка субстанции для хранения, в нормативной документации на лекарственный препарат приводится указание о гарантии качества ЛС по данному показателю. В спецификации на препарат, представляющий собой рекомбинантный вектор, должно быть указано, что производитель гарантирует, что содержание остаточной ДНК клеток хозяина не более 10 нг на дозу, содержание белков клеток хозяина – не более 1 % от содержания плазмиды, содержание других примесей должно быть регламентировано и обеспечивать безопасность препарата. Должен быть указан способ расчета данных примесей в лекарственном препарате.

Специфическая активность. Определяют эффективность трансфекции in vitro по транскрипции/трансляции кодируемых генов или in vivo по иммуногенности и/или другой целевой биологической активности. По возможности должны быть представлены доказательства того, что выбранный метод коррелирует с иммуногенностью или другой целевой активностью в клинических исследованиях. Для этих целей требуется хорошо охарактеризованный репрезентативный стандартный образец, аттестованный в установленном порядке. Обычно используют трансфекцию соответствующей линии клеток *in vitro*, с последующим измерением экспрессированного генетического материала по какой-либо функции, вместо оценки уровня экспрессии самого генетического материала. Может потребоваться проведение дополнительного определения активности с помощью метода вестерн-блота или твердофазного иммуноферментного анализа для оценки целостности и количества экспрессированного продукта. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот» и «Метод иммуноферментного анализа».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Показатели должны соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины». Требования к пробоподготовке препарата, тест-дозе в весовых, объемных или других единицах указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Аномальная токсичность. 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 содержания указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Каждый определяемый показатель должен быть указан в самостоятельном разделе.

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

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8° С, не допускается замораживания, в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Моноклональные антитела для медицинского применения **ОФС.1.7.1.0014.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на препараты моноклональных антител для медицинского применения, предназначенные для введения в организм человека с целью терапии и профилактики заболеваний.

Моноклональные антитела для медицинского применения представляют собой иммуноглобулины или фрагменты иммуноглобулинов, характеризующиеся строгой антигенной специфичностью и продуцируемые одним клоном клеток. Моноклональные антитела могут быть конъюгированы с другими веществами, в том числе с радиоактивными метками.

Моноклональные антитела получают с использованием рекомбинантной ДНК, гибридомной технологии, а также могут быть произведены с помощью других технологий.

Виды моноклональных антител:

Химерные моноклональные антитела, в которых вариабельные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека замещены соответствующими доменами иммуноглобулина другого видового происхождения (преимущественно грызунов - мыши или крысы), обладающими требуемой антигенной специфичностью.

Гуманизированные моноклональные антитела, в которых три короткие гипервариабельные последовательности вариабельных доменов каждой цепи

иммуноглобулина (участки, определяющие комплементарное связывание антигена - CDRs) имеют мышиное (или другое) происхождение и встроены в структуру вариабельных доменов иммуноглобулина человека. Другие изменения гипервариабельной последовательности могут быть введены для улучшения связывания антигена.

Рекомбинантные человеческие антитела, в которых вариабельные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека комбинированы с константным регионом иммуноглобулина человека.

Требования, изложенные в настоящей общей фармакопейной статье, не распространяются на моноклональные антитела, которые используются в качестве реагентов при производстве других лекарственных препаратов, на моноклональные антитела, получаемые *in vivo* (в виде асцита) и моноклональные антитела, предназначенные для диагностических целей *in vitro*.

Требования к препаратам моноклональных антител для медицинского применения, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство моноклональных антител должно осуществляться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики. При изменениях производственного процесса, представляются доказательства сопоставимости продуктов до и после внесения изменений. Изменения не должны оказывать влияние на качество препарата и/или стабильность, и воспроизводимость процесса производства.

Безопасность препаратов моноклональных антител основывается на строгом контроле исходных материалов. При оценке рисков контаминации исходного сырья и исходных материалов животного происхождения или от человека особое внимание уделяется риску, связанному с контаминацией губчатой энцефалопатией животных (ОФС «Уменьшение риска передачи

возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств») и латентными вирусами (ОФС «Вирусная безопасность»). При производстве моноклональных антител следует учитывать качество исходных материалов, непосредственно контактирующих с технологическим оборудованием или продукцией.

При производстве моноклональных антител используют систему банков клеток (Главного банка клеток и Рабочего банка клеток), полученных из клонированных клеток. Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратах» и ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Стадии производственного процесса получения моноклональных антител должны быть охарактеризованы в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК». Если на одной производственной площадке производят различные моноклональные антитела, метод оценки подлинности должен быть способен однозначно идентифицировать каждое производимое моноклональное тело в присутствии остальных.

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтических субстанций моноклональных антител регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Описание. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. Подтверждается комплексом взаимодополняющих методов (не менее 3), один из которых биологический – определение специфической активности, второй – пептидное картирование в соответствии с ОФС «Пептидное картирование», подтверждающий первичную аминокислотную последовательность, позволяющих специфически идентифицировать моноклональные антитела с использованием стандартных образцов. Подлинность моноклональных антител, помимо указанных методов, может быть подтверждена капиллярным электрофорезом, электрофорезом в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, изоэлектрическим фокусированием, определением гликанового профиля и другими методами с доказанной специфичностью. Выбор метода испытания должен быть обоснован.

Если моноклональное антитело конъюгировано с химическим веществом (токсином, радиоактивной меткой и др.), должны быть приведены методики, специфического подтверждения подлинности связанного с антителом фрагмента

Для испытаний могут использоваться методы в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия», ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Электрофорез», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и другие валидированные методики.

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию

Прозрачность. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Допустимый интервал значений pH указывается в фармакопейной статье и нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Чистота, родственные соединения и посторонние примеси оцениваются комплексом специфических (не менее 3) взаимодополняющих методов. Содержание родственных соединений и посторонних примесей может определяться методами электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; капиллярного электрофореза; изоэлектрофокусирования; высокоэффективной жидкостной хроматографии и другими валидированными методами, выбор которых должен быть обоснован. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Гликановый профиль. Содержание гликанов должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение гликанового профиля основано на предварительном выделении гликанов (отличающихся по своей структуре), из моноклональных антител с последующим разделением их на группы и идентифицированием. Испытание проводится одним из методов: обращено-фазовой и ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографией, нормально-фазовой хроматографией, обращено-фазовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием, электрофорезом с масс-спектрометрическим детектированием и другими валидированными методами.

Методики должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Остаточные белки клетки-хозяина. Нормы содержания должны соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Остаточные белки клетки-хозяина определяют радиоиммунологическим или иммуноферментным методом. Методика определения приводится в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Остаточная ДНК штамма-продуцента. Содержание не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации. Определение проводят методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином, другой меткой или другим валидированным методом, например, методом ПЦР или иммуноферментным методом (Treshold system).

Микробиологическая чистота. Субстанция до стерилизующей фильтрации должна соответствовать требованиям, предъявляемым к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной, если хранится после стерилизующей фильтрации. Испытания проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксична. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Белок. Требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с валидированной методикой.

Вещества, вносимые в субстанцию. Определяют количественное содержание веществ, используемых в качестве стабилизатора (например, полисорбат). Содержание полисорбата должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Определение полисорбата проводится в случае, если в состав входят соединения указанного класса.

Содержание полисорбата определяется методами: обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрии или иным валидированным методом. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Количественное определение связанного с антителом фрагмента. Если моноклональное антитело конъюгировано с химическим веществом (токсином, радиоактивной меткой и др.), в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию должны быть указаны требования и приведены методики количественного определения связанного с антителом фрагмента.

Специфическая активность. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Транспортирование и хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

Лекарственные препараты моноклональных антител выпускают в лекарственных формах для парентерального применения:

- инъекционные и инфузионные формы (раствор для инъекций, раствор для инфузии, раствор для подкожного введения),
- концентраты для приготовления инъекционных и инфузионных форм (концентрат для приготовления раствора для инфузий),
- твердые лекарственные формы, предназначенные для приготовления инъекционных и инфузионных лекарственных форм (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий и др.)

Лиофилизат может выпускаться в комплекте с растворителем, разрешенным для медицинского применения, растворитель не должен влиять на качество препарата.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата. Для лиофилизата отдельно приводится описание восстановленного раствора.

Подлинность. Подтверждается комплексом взаимодополняющих методов. Один из методов – определение специфической активности, второй – пептидное картирование (ОФС «Пептидное картирование»), подтверждающий первичную аминокислотную последовательность и третьим - может быть один из методов, приведенных ниже в соответствии с: ОФС «Масс-спектрометрия», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Если моноклональное антитело конъюгировано с химическим веществом (токсином, радиоактивной меткой и др.), должны быть приведены методики специфического подтверждения подлинности связанного с антителом фрагмента.

Прозрачность. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Время восстановления препарата (для лиофилизатов). Время восстановления лекарственного препарата указывается в фармакопейной статье или нормативной документации. Условия проведения испытания (применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, температуру растворителя, необходимость встряхивания) должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Лекарственный препарат (или восстановленный раствор) должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем (для растворов и концентратов). Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Осмолярность. Приводится допустимый интервал значений осмолярности лекарственного препарата (восстановленного раствора). Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Примечание: * - при необходимости показатель «Осмолярность» может быть заменен на показатель «Осмоляльность» с приведением обоснования замены.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Испытания проводят в соответствии с указанными ОФС.

Чистота. Родственные соединения, посторонние примеси. Определение проводится комплексом взаимодополняющих методов (не менее 3), включающих методы: электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; капиллярного электрофореза; изоэлектрофокусирования; высокоэффективной жидкостной хроматографии и другие валидированные методы, выбор которых должен быть обоснован. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

Гликановый профиль. Испытание проводится аналогично, как указано для фармацевтической субстанции.

Стерильность. Лекарственный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Аномальная токсичность. Лекарственный препарат должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Белок. Требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с другой валидированной методикой.

Вещества, вносимые в препарат. Определяют количественное содержание веществ, используемых в качестве стабилизатора (например, полисорбат). Определение полисорбата проводится для лекарственных препаратов, содержащих моноклональные антитела, в состав которых входят соединения указанного класса. Содержание полисорбата должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание полисорбата может быть определено методами обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрии и другими методами. Выбор методов оценки полисорбата должен быть обоснован. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Вода (для лиофилизатов). Предельно допустимое содержание воды и навеску препарата, в которой проводят определение, а также методику определения указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды».

Количественное определение связанного с антителом фрагмента.

Если моноклональное антитело конъюгировано с химическим веществом (токсином, радиоактивной меткой и др.), в фармакопейной статье или нормативной документации должны быть указаны требования и методики

количественного определения связанного с антителом фрагмента. Выбор методов должен быть обоснован.

Содержание связанного с антителом фрагмента должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Специфическая активность. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методы определения специфической активности с использованием стандартных образцов приводятся в фармакопейной статье или нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, не допускается замораживание.

Филграстимы **ОФС.1.7.1.0015.18**

Вводится впервые

Аминокислотная последовательность

MTPLGPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG GVLVASHLQS FLEVSYRVLR HLAQP

Эмпирическая формула $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$

Молекулярная масса ***18 799 Да***

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на филграстимы, действующим веществом которых являются негликозилированные белки, имеющие первичную структуру гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ с дополнительной аминокислотой (N-концевым метионином), синтезированный рекомбинантным штаммом бактерии *Escherichia coli*.

Г-КСФ человека продуцируется и секретируется эндотелиальными клетками, моноцитами и другими клетками иммунной системы. Белок стимулирует пролиферацию и дифференцировку лейкоцитарных стволовых клеток в зрелые гранулоциты и их выход в кровь из костного мозга.

Настоящая общая фармакопейная статья включает требования к рекомбинантному филграстиму (гранулоцитарно-колониестимулирующему фактору), полученному с использованием технологии рекомбинантной ДНК с применением в качестве экспрессионной системы бактериальные клетки.

Препараты филграстимов стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, и их высвобождение из костного мозга в кровь.

Требования, приведенные в настоящей общей фармакопейной статье, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

Данная статья не распространяется на модифицированные филграстимы (пегилированные филграстимы).

ПРОИЗВОДСТВО

Производство филграстимов осуществляется с применением технологии рекомбинантной ДНК и должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики.

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, производство лекарственного средства, включая банки штаммов-продуцентов, должны быть, охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

В качестве штамма-продуцента филграстима используют рекомбинантный штамм бактерии *Escherichia coli*, в геном которой методом генной инженерии встроен ген, кодирующий синтез Г-КСФ человека. Производство основано на системе банков клеток-продуцентов - Главного банка клеток (ГБК) и Рабочего банка клеток (РБК).

При изменениях производственного процесса, представляются доказательства сопоставимости продуктов до и после внесения изменений. Изменения не должны оказывать влияние на качество филграстима и/или стабильность и воспроизводимость процесса производства.

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтической субстанции регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Описание. Прозрачная, бесцветная жидкость, допускается слегка желтоватое окрашивание. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность должна быть подтверждена с помощью комплекса взаимодополняющих методов (не менее 3), один из которых биологический – определение специфической активности, второй – пептидное картирование. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пептидное картирование» - метод, подтверждающий первичную аминокислотную последовательность, позволяющие специфически идентифицировать филграстим с использованием стандартных образцов. Помимо указанных методов, подлинность может быть подтверждена методами: электрофорезом в полиакриламидном геле, изоэлектрическим фокусированием, обращено-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией и другими методами с доказанной специфичностью. Выбор метода испытания должен быть обоснован.

Для испытаний могут использоваться методы в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и другие валидированные методики. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Прозрачность. Раствор должен быть прозрачным или степень опалесценции не должна превышать эталон 1. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Раствор должен быть бесцветным или не должен превышать окраску эталона Y6. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Допустимый интервал значений pH указывается в фармакопейной статье и нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси.

Чистоту субстанции оценивают комплексом (не менее 3) взаимодополняющих методов, позволяющих охарактеризовать содержание соединений с молекулярной массой большей, чем молекулярная масса филграстима, примесей с зарядом и молекулярной массой, отличающейся от филграстима, родственных белков.

в зависимости от вида примеси определяют:

- содержание соединений с молекулярной массой большей, чем молекулярная масса филграстима не должно превышать 2 % (испытания проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»);
- содержание соединений с зарядом, отличающимся от филграстима не должно превышать 10 % (испытание проводят методом изоэлектрического фокусирования в соответствии с ОФС «Изофокусирование»);
- содержание соединений с молекулярной массой, отличающейся от филграстима не должно превышать 2 % (испытания проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE электрофорез) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в соответствии с ОФС «Электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле»);
- родственные белки: содержание единичной родственной примесей не должно превышать 2 %, суммы - 3,5 % (испытания проводят методом

жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Хроматография» и ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Методики испытаний должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Выбор методов оценки чистоты должен быть обоснован.

Остаточные белки клетки-хозяина. Приводят нормы по содержанию остаточных белков клетки-хозяина. Остаточные белки клетки-хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или ИФА). Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Содержание остаточных белков клеток-хозяина и ДНК штамма-продуцента не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации, и не превышать показателей, определенных международными требованиями.

Остаточная ДНК штамма-продуцента. Нормативные требования не должны превышать значений, указанных в фармакопейной статье или в нормативной документации и недолжны превышать показателей, определенных международными требованиями.

Определение проводят методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином, другой меткой или другим валидированным методом. Определение проводят методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином, другой меткой или другим валидированным методом. Возможно использования готовых наборов реагентов, с использованием валидированной методики.

Микробиологическая чистота. Субстанция до стерилизующей фильтрации должна выдерживать требования, предъявляемые к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной, если хранится после стерилизующей фильтрации. Испытания стерильности проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксична. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Белок. Требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» или ОФС «Определение белка» или в соответствии с другой валидированной методикой.

Вещества, вносимые в субстанцию. Проводят определение количественного содержания веществ, используемых в качестве стабилизатора (например, полисорбат). Содержание полисорбата должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Определение полисорбата проводится в случае, если в состав субстанции входят соединения указанного класса.

Содержание полисорбата определяют методами: обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрии или иным валидированным методом. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Полисорбат**.** Содержание полисорбата должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Определение проводится для субстанций, в состав которых входят соединения указанного класса.

Методика определения, параметры пригодности системы и нормы определяются типом полисорбата, входящего в состав филграстима и используемым методом испытания.

Выбор метода оценки полисорбата должен быть обоснован. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Специфическая активность. Субстанция должна выдерживать требования, указанные в фармакопейной статье или нормативной документации. Специфическая активность должна составлять не менее $1{,}0 \cdot 10^8$ МЕ на 1 мг белка. Количественное определение активности филграстима проводят с использованием биологического метода *in vitro* на соответствующей линии клеток, чувствительных к филграстиму, оценивая их пролиферацию под влиянием филграстима.

Специфическую активность определяют путем сопоставления активности разведений субстанции и разведений Международного Стандарта филграстима или стандартного препарата, калиброванного по Международному Стандарту в международных единицах.

Методика должны быть изложена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Транспортирование и хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

Лекарственные препараты на основе филграстима выпускают в формах для парентерального применения: раствор для инъекций (для внутривенного и подкожного введения) и инфузий.

Требования к испытаниям лекарственных препаратов филграстима регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата.

Подлинность. Подлинность подтверждается комплексом взаимодополняющих методов, позволяющих специфически идентифицировать филграстим, среди которых обязательными являются биологический и метод пептидного картирования. Испытания подлинность лекарственного препарата проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и др.

Прозрачность. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Лекарственный препарат должен соответствовать требования, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Указывается допустимый интервал значений pH. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье и нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Осмолярность*. Указывается допустимый интервал значений осмолярности лекарственного препарата. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Примечание: * - при необходимости показатель «Осмолярность» может быть заменен на показатель «Осмоляльность» с приведением обоснования замены.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Испытания проводят в соответствии с указанными ОФС.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси.

Испытание проводится аналогично, как указано для фармацевтической субстанции.

Стерильность. Лекарственный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Бактериальные эндотоксины. Содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на

лекарственный препарат. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Лекарственный препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Белок. Требования должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с другой валидированной методикой.

Выбор метода определения белка должен быть обоснован.

Вещества, вносимые в препарат.

Полисорбаты**.** Определение проводится для лекарственных препаратов филграстимов, в состав которых входят соединения указанного класса. Используется метод обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрический метод или иной метод с доказанной специфичностью, правильностью и прецизионностью.

Методика определения, параметры пригодности системы и нормы определяются типом полисорбата, входящего в состав лекарственного препарата и используемым методом испытания.

Выбор метода оценки полисорбата должен быть обоснован. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Испытание проводится аналогично, как указано для фармацевтической субстанции.

Специфическая активность. Специфическая активность должна соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Количественное определение активности филграстима проводят с использованием биологического метода *in vitro* на соответствующей линии клеток, чувствительных к филграстиму, оценивая их пролиферацию под влиянием филграстима.

Специфическую активность лекарственного препарата определяют путем сопоставления активности разведений испытуемого препарата и разведений Международного Стандарта филграстима или стандартного препарата, калиброванного по Международному Стандарту в международных единицах.

Испытание проводят в соответствии с методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Методы определения специфической активности с использованием стандартных образцов приводятся в фармакопейной статье или нормативной документации.

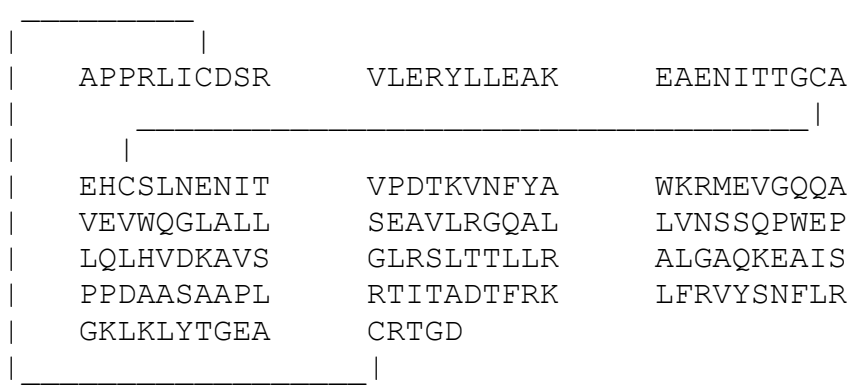
Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование, хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, не допускается замораживание.

Эритропоэтины **ОФС.1.7.1.0016.18**

Вводится впервые

Аминокислотная последовательность



Молекулярная масса около 30600 Да

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на эритропоэтины (эпоэтины), представляющие собой гликопротеин с аминокислотной последовательностью, включающей 165 аминокислот и углеводные цепи, присоединённые в участках гликозилирования с образованием трёх N-связей и одной O-связи, с прикреплением сиаловых кислот в терминальных отделах углеводородных цепочек. Сайты N-гликозилирования: asn (24), asn (38), asn (83); сайт O-гликозилирования: thr (134). Трёхмерная структура сформирована за счёт двух дисульфидных связей между цистеинами в положении 7-161 и 29-33, которые необходимы для проявления биологической активности. Углеводная часть составляет 40–50 % массы молекулы гликопротеина, из которых около 17 % приходится на сиаловые кислоты. Аминокислотная последовательность эпоэтина идентична

эндогенному человеческому эритропоэтину, продуцируемому клетками почек человека и различается профилем гликозилирования (α, β и др.).

Настоящая общая фармакопейная статья включает требования к эритропоэтинам, полученным с использованием технологии рекомбинантной ДНК с применением в качестве экспрессионной системы клеток млекопитающих.

Эритропоэтины специфически стимулируют пролиферацию и дифференцировку клеток эритроцитарного ростка. Препараты эритропоэтинов применяют для профилактики и лечения анемий различного генеза.

Требования, приведенные в настоящей общей фармакопейной статье, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

Данная ОФС не распространяется на эритропоэтины с изменённой аминокислотной последовательностью (дарбэпоэтин) и модифицированные эритропоэтины (пегилированные эритропоэтины).

ПРОИЗВОДСТВО

Производство эритропоэтинов проводится с использованием технологии рекомбинантной ДНК и должно осуществляться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики. При изменениях производственного процесса представляются доказательства сопоставимости продуктов до и после внесения изменений. Изменения не должны оказывать влияния на качество эпоэтина и/или стабильность процесса производства.

Безопасность эритропоэтинов основывается строгим контролем исходных материалов. При оценке рисков контаминации исходного сырья и материалов животного происхождения, особое внимание уделяют губчатой энцефалопатии животных (ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств») и вирусам, вызывающим латентные инфекции (ОФС «Вирусная безопасность»).

Также должно быть уделено внимание исходным материалам, непосредственно контактирующим с технологическим оборудованием или продукцией.

Производство эритропоэтинов основано на системе банков клеток-продуцентов - Главного банка клеток (ГБК) и Рабочего банка клеток (РБК). Для создания штамма-продуцента эритропоэтина используются клетки линий млекопитающих животных (клетки яичника китайского хомячка (CHO), из почки хомячка (BHK) и др. Рекомбинантный штамм-продуцент получают путем трансформации клеточной линии плазмидой, содержащей ген человеческого эритропоэтина. Полученный штамм-продуцент секретирует эритропоэтин при культивировании на синтетических питательных средах *in vitro*.

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, производство лекарственного средства, включая банки клеток-продуцентов, должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов» и ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

При изменениях производственного процесса представляют доказательства сопоставимости продуктов до и после внесения изменений. Изменения не должны оказывать влияния на качество эпоэтина и/или стабильность процесса производства.

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Требования к испытаниям фармацевтических субстанций эритропоэтинов регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Описание. До замораживания и после размораживания (оттаивания) бесцветный прозрачный или слегка опалесцирующий раствор. В замороженном состоянии – плотная бесцветная затвердевшая масса. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность должна быть подтверждена с помощью комплексом взаимодополняющих методов (не менее 3, позволяющих специфически идентифицировать эритропоэтин с использованием стандартных образцов), один из которых биологический – определение специфической активности в соответствии с ОЛФС «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина», второй метод пептидного картирования, в соответствии с ОФС «Пептидное картирование», подтверждающий первичную аминокислотную последовательность.

Подлинность эритропоэтина, помимо указанных методов, может быть подтверждена методами: капиллярным электрофорезом; электрофорезом в полиакриламидном геле (в том числе, с последующим иммуноблоттингом); иммуноферментным анализом; изоэлектрическим фокусированием и другими методами с доказанной специфичностью. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован. Испытания проводятся в соответствии с ОФС «Капиллярный электофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты методом вестерн-блот». Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Прозрачность. Раствор должен быть прозрачным или степень опалесценции не должна превышать эталон 1. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Раствор должен быть бесцветный. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси.

Испытания проводят комплексом специфических (не менее 3) взаимодополняющих методов, определяющих содержание основного компонента и родственных соединений – агрегатов, димеров, модифицированных форм белка, посторонних примесей. Содержание

родственных соединений и посторонних примесей может определяться методами электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; капиллярного электрофореза; изоэлектрофокусирования; высокоэффективной жидкостной хроматографии и другими валидированными методами, выбор которых должен быть обоснован. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Гликановый профиль. Проводится оценка общего профиля гликанов (олигосахаридов), отщепленных от гликопротеина. Определяют содержание различных групп олигосахаридов, связанных с белковой частью молекулы эритропоэтина. Нормируют содержание отдельных, наиболее значимых гликановых структур. Также может быть оценена степень сиалирования гликопротеина.

Гликановый профиль эритропоэтина может быть определён методами обращёно-фазовой и ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии, нормально-фазовой хроматографией, обращено-фазовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, электрофорезом с масс-спектрометрическим детектированием и другими методами. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Сиаловые кислоты. Не менее 10 молей сиаловых кислот (в пересчете на N-ацетилнейраминовую кислоту) на 1 М эритропоэтина. Испытание проводят в соответствии с методикой, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Остаточные белки клетки-хозяина. Приводят нормы по содержанию остаточных белков клетки-хозяина. Содержание не должно превышать значений, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или иммуноферментным (ИФА)). Испытание проводят в соответствии с методикой, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для определения остаточных белков клеток-хозяина возможно использования готовых наборов реагентов, использование которых должно быть подтверждено материалами валидации методики.

Остаточная ДНК штамма-продуцента. Приводят нормы по содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента. Содержание не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации. Испытания проводят методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином, другой меткой или другим валидированным методом, например, методом ПЦР или иммуноферментным методом (Treshold system).

Для определения остаточной ДНК штамма-продуцента возможно использования готовых наборов реагентов, использование которых должно быть подтверждено материалами валидации методики.

Микробиологическая чистота. Субстанция до стерилизующей фильтрации должна соответствовать требованиям, предъявляемым к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной, если хранится после стерилизующей фильтрации. Испытания проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Белок. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с другой валидированной методикой.

Вещества, вносимые в субстанцию. Проводят количественное определение содержания веществ, используемых в качестве стабилизатора (например, полисорбат). Содержание полисорбата должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Определение полисорбата проводится в случае, если в состав входят соединения указанного класса.

Содержание полисорбата определяется методами: обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрии или иным валидированным методом. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Бактериальные эндотоксины. Содержание не должно превышать значений, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. Содержание активного вещества должно составлять не менее 80 % и не более 125 % от заявленного содержания. При доверительном интервале (P = 0,95) рассчитанной активности должны быть не ниже 64 % и не более 156 % от заявленной величины.

Определение специфической активности проводят биологическим методом *in vivo,* оценивая стимуляцию продукции ретикулоцитов у нормоцитемических мышей. Активность субстанции сравнивают с активностью фармакопейного стандартного образца эритропоэтина BRP и выражают в

международных единицах (МЕ). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности эритропоэтинов.

Удельная активность. Расчетная величина, вычисляется по формуле, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Должна быть не менее 100000 МЕ/мг. Удельная активность является расчетной величиной, равной отношению специфической активности в МЕ/мл к содержанию белка эритропоэтина в мг/мл.

Транспортирование и хранение. В герметичном контейнере при температуре ниже минус 20°С (или в соответствии с указаниями в нормативной документации). Недопустимо повторное замораживание и оттаивание образца.

ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

Лекарственные препараты на основе рекомбинантного эритропоэтина выпускают в формах для парентерального применения: раствор для инъекций и лиофилизат. Лиофилизат может выпускаться в комплекте с растворителем, разрешенным к медицинскому применению.

Требования к испытаниям лекарственных препаратов эритропоэтина регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения»

Описание. Приводится описание свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного препарата. Для лиофилизата отдельно приводится описание восстановленного раствора.

Подлинность. Подтверждается комплексом взаимодополняющих методов, позволяющих специфически идентифицировать эритропоэтин (с использованием стандартных образцов) один из которых биологический – определение специфической активности, второй – пептидное картирование, в соответствии с ОФС «Пептидное картирование», подтверждающий первичную

аминокислотную последовательность. Подлинность эритропоэтина, помимо указанных методов, может быть подтверждена капиллярным электрофорезом, электрофорезом в полиакриламидном геле (в том числе, с последующим иммуноблоттингом), изоэлектрическим фокусированием, и другими методами с доказанной специфичностью. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован. Испытания проводятся в соответствии с ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты методом вестерн-блот» и другимиподходящими валидированными методами. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации.

Прозрачность. Раствор должен быть прозрачным или степень опалесценции не должна превышать эталон 1. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Раствор должен быть бесцветным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Время восстановления препарата (для лиофилизатов). Время восстановления лекарственного препарата указывается в фармакопейной статье или нормативной документации. Условия проведения испытания (применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, температуру растворителя, необходимость встряхивания) должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Испытания проводят в соответствии с указанными ОФС.

Извлекаемый объем (для растворов). Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Должно быть указано содержание основного компонента, родственных соединений – агрегатов, димеров, модифицированных форм белка и посторонних примесей.

Чистота, содержание родственных соединений и посторонних примесей может определяться комплексом взаимодополняющих методов (не менее 3), включающих: электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE электрофорез) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; капиллярный электрофорез; изоэлектрофокусирование; высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и другие методы с доказанной специфичностью, правильностью и прецизионностью. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Электрофорез», ОФС «Капиллярный электрофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот», ОФС «Метод иммуноферментного—анализа». Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Содержание димеров и высокомолекулярных родственных веществ эритропоэтина в испытуемом образце должно быть не более 2 %.

Сиаловые кислоты. Не менее 10 молей сиаловых кислот (в пересчете на N-ацетилнейраминовую кислоту) на 1 М эритропоэтина. Испытание проводят в

соответствии с методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Пирогенность. Лекарственный препарат должен быть апирогенным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Бактериальные эндотоксины. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Белок. Содержание должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» и ОФС «Определение белка» или в соответствии с методикой, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вещества, вносимые в препарат. Проводят определение количественного содержания веществ, используемых в качестве стабилизатора например, полисорбаты, испытания которых проводится для лекарственных препаратов, содержащих эритропоэтины, в состав которых входят соединения указанного класса. Используется метод обращено-фазовой хроматографии, газовой хроматографии, спектрометрический метод или другой валидированный метод с доказанной специфичностью, правильностью и прецизионностью.

Методика определения, параметры пригодности системы и нормы определяются типом полисорбата, входящего в состав эритропоэтина и используемым методом испытания.

Выбор метода оценки полисорбата должен быть обоснован. Методика должна быть приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Вода (для лиофилизатов). Предельно допустимое содержание воды и навеску препарата, в которой проводят определение, а также методику определения, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды».

Однородность дозирования (для лиофилизатов). Должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

Специфическая активность. Содержание активного вещества должно составлять не менее 80 % и не более 125 % от заявленного содержания. Доверительные интервалы (P = 0,95) рассчитанной активности должны быть не ниже 64 % и не более 156 % от заявленной величины.

Определение активности проводят биологическим методом *in vivo,* оценивая стимуляцию продукции ретикулоцитов у нормоцитемических мышей. Активность препарата сравнивают с активностью фармакопейного стандартного образца эритропоэтина BRP и выражают в международных единицах (МЕ).

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности эритропоэтинов».

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование, хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, не допускается замораживание.

Генно-инженерные препараты инсулина человека **ОФС.1.7.1.0017.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на генно-инженерные препараты инсулина человека, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК из генетически стабильных и безопасных микроорганизмов.

Требования, изложенные в настоящей общей фармакопейной статье, не распространяются на бычий инсулин, свиной инсулин и инсулин полусинтетический.

Инсулин представляет собой двухцепочечный пептид, имеющий структуру антидиабетического гормона, вырабатываемого поджелудочной железой человека.

Требования на генно-инженерные препараты инсулина человека, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство инсулина осуществляется с применением технологии рекомбинантной ДНК и должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

В качестве клеток-хозяина для создания штамма-продуцента используются бактерии (*Escherichia coli*) или грибы (*Saccharomyces cerevisiae*

или *Pichia pastoris*). Производство основано на системе банков клеток-продуцентов - Главного банка клеток (ГБК) и Рабочего банка клеток (РБК).

Схема производственного процесса генно-инженерных препаратов инсулина, как правило, включает:

1. Получение посевного материала штамма-продуцента.
2. Биосинтез рекомбинантного белка (РБ) (препроинсулина):

- ферментация (культивирование продуцента);
- сепарирование (получение биомассы);
- дезинтеграция клеточной суспензии;
- центрифугирование (выделение и отмывка телец включения).

3. Выделение и очистка РБ (препроинсулина).
4. Солюбилизация телец включения и восстановление (денатурация) РБ:

- ренатурация (рефолдинг) РБ;
- хроматографическая очистка проинсулина.

5. Ферментативное расщепление проинсулина.
6. Ступени очистки инсулина, каждая из которых включает несколько стадий очистки, например:

- хроматографическая очистка инсулина 1
- хроматографическая очистка инсулина 2
- хроматографическая очистка инсулина 3

7. Получение кристаллического инсулина:

- кристаллизация и отмывка;
- высушивание.

8. Получение лекарственной формы .

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 штамм-продуцент (ДНК), примеси, связанные с процессом производства, например, гетерологичных белков (иммуногенные примеси, компоненты

питательных сред, иммуносорбенты для афинной хроматографии и пр.). На всех этапах производства должно контролироваться качество всех полупродуктов и продуктов в соответствии с установленными требованиями или спецификациями.

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, производство лекарственного средства, включая банки штаммов-продуцентов, должны быть, охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

При изменениях производственного процесса, представляются доказательства сопоставимости продуктов до и после внесения изменений. Изменения не должны оказывать влияние на качество инсулина и/или стабильность и воспроизводимость процесса производства.

ИСПЫТАНИЯ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СУБСТАНЦИЯ

Требования к испытаниям фармацевтических субстанций инсулина регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Описание. Белый или почти белый порошок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность подтверждается методом ВЭЖХ с использованием стандартного образца (пептидным картированием, идентификацией основного вещества), а также определением биоидентичности.

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС «Пептидное картирование», ОФС «Биологическое испытание инсулина».

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Растворимость. Указывают не менее трех растворителей субстанции (например, вода, хлороформ или этанол, разбавленные растворы минеральных кислот и щелочей). Концентрации используемых растворов кислот и щелочей

должны быть определенны в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

Прозрачность. Раствор должен быть прозрачным или степень опалесценции не должна превышать эталон I. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Раствор должен быть бесцветным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Вода или Потеря в массе при высушивании. Предельно допустимое содержание воды и навеску субстанции, в которой проводят определение, а также методику определения, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды» или ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Содержание родственных соединений и посторонних примесей определяться методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», а так же другими физико-химическими методами.

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

В зависимости от вида соединения определяют:

- содержание высокомолекулярных белков (примеси): уровень которых не должен превышать 1,0 %. Испытания проводят методом эксклюзионной хроматографии;

- содержание родственных соединений (А21-дезамидоинсулин и другие родственные белки, установленной структуры). Уровень А21-дезамидоинсулина и родственных белков установленной структуры нормируется индивидуально. Содержание А21-дезамидоинсулина не должно превышать 2,0 %; родственных белков установленной структуры – не должно превышать 1,0 %. Содержание А21-дезамидоинсулина и родственных белков установленной структуры также может нормироваться суммарно. При этом их

суммарный уровень не должен превышать 2,0 %. Испытание проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ;

- посторонние примеси (нормированию подлежит содержание единичная примесь и сумма примесей, при этом содержания А21-дезамидоинсулина и родственных белков установленной структуры не учитываются). Испытание проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ.

Уровень содержания примесей и родственных соединений нормируется в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Сульфатная зола. Не более 10,0 %. Испытание проводят в соответствие с методикой определения, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Цинк. Не более 1,0 % в пересчете на сухое вещество. Испытание проводят методом атомной абсорбционной спектрометрии в соответствие с ОФС «Атомная абсорбция» или иным валидированным методом.

Методика определения, приводится в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Проинсулин. Не более 10 ppm. Испытание проводят в соответствие с методикой определения, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Контроль содержания проинсулина предусматривает в случае, если молекулу инсулина получают отщеплением от молекулы проинсулина (внеклеточная экспрессия).

Одноцепочечный предшественник. Контроль содержания одноцепочечного предшественника предусматриваться в случае, если производство инсулина осуществляется методом раздельного конструирования цепей инсулина (Two-chain method).

Остаточные белки штамма-продуцента. Не более 10 ppm. Остаточные белки клетки-хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или ИФА). Методика должна быть

приведена в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Остаточная ДНК штамма-продуцента и плазмидная ДНК. Не более 10 ppm. Определяют методом гибридизации с зондами, меченными биотином, дигоксигенином, другой меткой или другим валидированным методом, например, методом ПЦР или иммуноферментным методом (Treshold system).

Содержание остаточных белков штамм-продуцента и ДНК штамма-продуцента не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации, и не превышать показателей, определенных международными требованиями.

Микробиологическая чистота. Субстанция должна выдерживать требования, предъявляемые к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения (категория 1.2.Б). Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Бактериальные эндотоксины. Не более 10 ЕЭ/мг. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Количественное определение. Не менее 27,5 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество. Испытания проводят методом ВЭЖХ, в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Биологическая активность. Не менее 27,5 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество. Определяют по гипогликемическому действию субстанции в сравнении с международным стандартным образцом человеческого инсулина (USP RS или международный стандартный образец или ГСО). Испытание проводят соответствие с ОФС «Биологические испытания инсулина».

Транспортирование и хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации.

ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

Лекарственные генно-инженерные препараты инсулина человека выпускают в лекарственных формах для парентерального применения (раствор для подкожного введения).

Требования к испытаниям лекарственных препаратов инсулина человека регламентируются нижеприведёнными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Растворы».

Описание. Бесцветный прозрачный раствор без посторонних включений.

Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность подтверждается методом ВЭЖХ с использованием стандартного образца (пептидным картированием, идентификацией основного вещества), а также определением биологической активности и/или биоидентичности.

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Пептидное картирование» и ОФС «Биологические испытания инсулина».

Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Извлекаемый объем должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Осмолярность. Приводится допустимый интервал значений осмолярности лекарственного препарата. Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Примечание: * - при необходимости показатель «Осмолярность» может быть заменен на показатель «Осмоляльность с приведением обоснования.

Механические включения. Видимые и невидимые частицы должны соответствовать требованиям, указанным в 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», соответственно. Испытание проводят соответствующими методами, указанными в ОФС.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. В зависимости от вида соединения определяют:

- содержание высокомолекулярных белков (примеси). Испытания проводят методом эксклюзионной хроматографии;

- содержание родственных соединений, к которым относится А21-дезамидоинсулин и другие родственные белки установленной структуры;

- посторонние примеси.

Уровень содержания примесей и родственных соединений нормируется в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Испытание проводят в соответствие с методиками определения, приведёнными в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Пролонгированное действие. Лекарственный препарат должен соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствие с методикой определения, приведённой в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Контроль пролонгированного действия предусматривается в случае, если лекарственный препарат обладает пролонгированным действием.

Стерильность. Лекарственный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Бактериальные эндотоксины. Указывают допустимое содержание бактериальных эндотоксинов. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Вещества, вносимые в препарат. Определяют количественное содержание веществ, используемых в качестве консервантов. Содержание консерванта, должно соответствовать нормам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Используемый метод, методика определения и нормы определяются типом соединения, входящего в состав лекарственного препарата и приводятся в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат. Выбор метода определения должен быть обоснован.

Количественное определение. Содержание действующего вещества должно соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят методом ВЭЖХ, в соответствии с ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Биологическая активность. Не менее 27,5 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество. Определяют по гипогликемическому действию лекарственного

препарата в сравнении с международным стандартным образцом человеческого инсулина (USP RS или международный стандартный образец или ФСО). Испытание проводят по ОФС «Биологические испытания инсулина».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, не допускается замораживание, если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иное.

Иммунобиологические лекарственные препараты

ОФС.1.7.1.0018.18

Взамен ОФС.1.8.1.0002.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологические лекарственные препараты. Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) – лекарственные препараты биологического происхождения, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета либо диагностики наличия иммунитета или диагностики специфического приобретенного изменения иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К ИЛП относятся вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены. По своему назначению ИЛП подразделяют на лечебные и лечебно-профилактические, собственно профилактические и диагностические.

ИЛП выпускают в виде монопрепаратов и комплексных (комбинированных или ассоциированных) препаратов.

В состав ИЛП могут входить вспомогательные вещества различного функционального назначения (адъюванты, 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). 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 птицехозяйств, 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 ± 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 табл.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. Лиофилизаты 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 бактерийных 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 суппозиториев). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе».

pH. Указывается допустимый интервал значений pH. 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, суппозиториев, 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 инактивированных или субъединичных (например, химических вакцин) бактерийных 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 препаратах из сыворотки крови человека;

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, LD_{50}).

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, объем, 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 8^0С, 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 фактических материалом. При этом в соответствующем разделе нормативной документации должно содержаться указание о правилах фиксирования продолжительности данного режима транспортирования.

Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo* ОФС.1.7.2.0001.15

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 препарата[1].

Пробоподготовка

Испытуемый препарат растворяют или разводят, в случае необходимости, 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций, подогретым до температуры 37 ^{0}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 ^{0}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 ± 1) ^{o}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 ^{0}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 ± 1) ^{o}C; через 20 – 30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния;
- *суппозитории*: 6 суппозиториев заливают 3 мл (из расчета 0,5 мл на 1 суппозиторий) 0,9% раствора натрия хлорида, предварительно нагретого до температуры (39 ± 1) ^{o}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 испытуемого 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 мыши 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 мышей.

Учет и итерпретация 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 невирулентным.

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 ^{0}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 внутрибрюшино 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 итерпретация 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 ± 1) °С 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 итерпретация 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.

Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток **ОФС.1.7.2.0002.15**

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 гортани человека Нер-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 следующих 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 10^5ТЦД/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 МЕМ, МЕМ**,** DMEM (двойная модификация среды Игла), среды 199 , среды RPMI и др. Для стимуляции роста, прикрепления и деления клеток обычно добавляют 5 – 10 % инактивированной 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-глютамина в питательной среде должно быть около 292 мг/л.

В качестве поддерживающей среды обычно используют питательную среду без сыворотки с добавлением антибиотиков и L-глютамина.

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 монослое культур клеток, полученном при температуре (37±1) ^{0}С в атмосфере с (5,0±0,5) % 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±1) ^{0}С в атмосфере с

(5,0±0,5) % 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±1) ^{0}С в атмосфере с (5,0±0,5) % 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 – $ТЦД_{50}$/мл.

Активность вируса вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\lg ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \bullet \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

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 $ТЦД_{50}$ 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±1) ^{0}С в атмосфере с (5,0±0,5) % 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 $ТЦД_{50}$ 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, зараженными 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:

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \bullet \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

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:

$$A_X = \frac{A_{CO}}{a_{CO}} \bullet a_X,$$

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:

$$A_X = \frac{A_{CO}}{a_{CO}} \bullet a_X ,$$

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 противовирусной 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±1) ^{0}C в атмосфере с (5,0±0,5) % 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±1) ^{o} C в атмосфере с (5,0±0,5) % 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 $ТЦД_{50}$ вносят во все лунки 96-луночного планшета, кроме 4 лунок, предназначенных для контроля монослоя клеток.

После внесения индикаторного вируса в лунки с культурой клеток планшеты инкубируют при температуре (37±1) ^{0}С в атмосфере с (5,0±0,5) % CO_2 до появления первых признаков цитопатических изменений в клетках с индикаторным вирусом в дозе 1 $ТЦД_{50}$ (обычно в течение 24-48 ч). Монослой в лунках с 0,1 $ТЦД_{50}$ 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 $ТЦД_{50}$;
- отсутствуют признаки дегенерации в контроле клеток и в лунках с рабочими разведениями СО и ИП без нейтрализующих антител.

Нейтрализация активности испытуемого образца антиинтерфероновыми 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

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 LD_{50} дифтерийного токсина. Наблюдение проводят в течение 5 сут, регистрируя число выживших животных в каждой группе, и рассчитывают для вакцины и референс-препарата величины ED_{50} (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 LD_{50} (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 (pH 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 LD_{50}. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} 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 $LD_{50.}$ 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 ED_{50} 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.

LD_{50} 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

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 LD_{50} столбнячного токсина. Наблюдение проводят в течение 4 сут, регистрируя число выживших животных, и рассчитывают величины ED_{50} (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 LD_{50} (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, pH (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) LD_{50} столбнячного токсина в объеме 0,5 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} 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 $LD_{50.}$ 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 ED_{50} для референс-препарата и испытуемой вакцины. Также рассчитывают количество LD_{50} токсина, введенного иммунизированным животным.

Формула Кербера:

– для испытуемого образца и референс-препарата:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \sigma(\Sigma Li - 0{,}5),$$

– для токсина:

$$Lg\ LD_{50} = \lg D_N - \sigma(\Sigma Li - 0{,}5),$$

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 LD_{50} – 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

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 pH 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 pH 7,1–7,2, разливают по (200 ± 5) мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл и стерилизуют при температуре 110 ºС в течение 30 мин. Среду Борде-Жангу хранят при температуре от 2 до 8 ºС 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 втечение 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 ºС, 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 ºС.

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 до160 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 ± 0,15) %, аминного азота (155 ± 10 мг %); pH среды доводят до 7,0–7,1 с помощью 20 % раствора натрия гидроксида.

Среду разливают в матрацы по (250 ± 10) мл, пробирки по (11 ± 1) мл и флаконы вместимостью 500 мл по (200 ± 5) мл, стерилизуют 30 мин при температуре 110 ºС и хранят при температуре от 2 до 8 ºС не более 1 мес. Для получения среды с 10 % крови содержимое флакона растапливают, охлаждают до температуры 50–55 ºС, вносят 20 мл дефибринированной

крови человека и перемешивают. Срок хранения среды с кровью 10 сут при температуре от 2 до 8 ºС.

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 ºС. Среду используют свежеприготовленной (при добавлении 0,5 % хлороформа срок хранения 1 год при температуре от 2 до 8 ºС).

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 ºС.

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±0,2). Среду стерилизуют 15 мин при температуре 121 ºС. Срок хранения 6 мес. Каждую серию гидролизата казеина проверяют на безвредность путем внутримозгового 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 3 группы для испытуемого и референс-препаратов. Одновременно для контроля вирулентности заражающего штамма *B. pertussis* 18323

(определение LD_{50} 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 ED_{50}.

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 ED_{50} 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 ºС и используют в течение не более 4 ч.

Таблица 2 **– Пример разведения испытуемой вакцины**

Разведение	Объем вносимого I разведения вакцины, мл	Объем вносимого растворителя, 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 тест-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±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	$1_I : 10$	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 ± 0,5) ^{o}C на 3–4 сут. Для определения количества КОЕ в 30 мкл проводят подсчёт 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 LD_{50} (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 заражаю-щей 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		
			∑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 (А), по горизонтальной оси – разницу между числом мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз, взятых в опыт (В). В месте пересечения прямых, проведённых от соответствующих величин А и В, 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.

Таблица 5 – **Таблица Вильсона-Вустера**

Приложение

Таблица Вильсона-Вустера

Общее число мышей, выживших на все 3 дозы	Разница выживших от наибольшей и от наименьшей дозы											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
41	10.1 48-208	14,5 66-154										
40	9,4 42-236	13,6 58-172	17,2 71-140									
39	9,4 38-260	13,4 53-187	17,0 66-153	20,3 76-133								
38	9,5 36-276	13,75 50-199	17,6 62-163	20,75 71-142	23,1 78-128							
37	10,2 35-288	14,5 48-208	18,5 59-170	21,7 67-148	24,3 74-134	25,9 80-125						
36	11,3 34-295	15,5 47-213	19,7 57-175	23,1 65-154	25,9 71-140	28,0 76-131	29,0 81-124					
35	12,3 34-296	17,0 46-217	21,3 56-178	25,1 64-157	28,0 70-144	29,9 74-135	31,4 78-128	32,9 81-124				
34	14,0 34-294	19,0 46-218	23,5 55-181	27,25 63-160	30,4 68-147	32,9 73-137	34,6 76-131	35,7 49-126	39,9 81-124			
33	16,5 35-288	21,7 46-217	26,3 55-181	29,9 62-161	33,5 67-149	35,7 72-140	38,1 75-133	39,3 78-129	40,6 80-125			
32	19,4 36-279	25,1 47-214	29,4 55-181	33,5 62-162	36,8 67-150	39,3 71,141	41,9 74-134	43,25 77-131	44,0 79-127	47,7 81-124		
31	23,1 37-268	29,0 48-210	34,0 56-180	38,1 62,162	41,3 67-150	44,0 70-143	46,2 73-136	47,75 76-132	48,5 78-128	50,0 80-125		
30	28,0 39-258	34,0 49-205	38,7 56-178	43,3 62-162	46,2 66-151	49,25 70-143	50,9 73-136	52,5 75-134	53,5 77-130	55,1 79-126	59,7 81-123	61,7 82-121
29	34,0 41-244	39,9 50-201	44,7 57-176	49,25 62,161	52,5 66-151	55,1 70-144	56,9 72-139	57,8 75-134	59,7 77-130	60,7 79-126	62,75 81-123	64,8 82-121
28	41,9 43-233	47,7 50-196	52,5 57-174	56,0 62-161	58,8 66-151	61,7 70-144	63,7 72-139	64,8 75-134	65,8 77-131	66,9 79-137	69,1 81-123	71,3 82-121
27	51,7 43-224	56,9 52-192	61,7 58-173	64,6 63-160	66,9 66-151	69,1 70-144	71,3 72-139	72,5 74-135	72,5 76-131	73,6 79-128	74,8 81-123	76,41 82-121
26	64,8 44-217	69,1 53-188	72,5 58-171	74,8 63-160	76,1 67-150	78,6 70-144	79,8 72-139	79,8 74-134	84,4 76-131	84,4 78-128	82,4 81-123	82,4 82-121
25	79,8 47-211	82,4 54-187	85,1 59-170	86,5 63-159	87,9 67-150	87,9 70-144	89,25 72-139	89,25 74-134	89,25 76-131	90,8 78-128	90,8 81-123	90,8 82-121
24	100 48-211	100 54-186	100 59-170	100 63-159	100 67-150	100 70-144	100 72-139	100 74-134	100 77-131	100 79-127	100 81-123	100 83-120
23	125,3 47-211	121,3 54-187	117,5 59-170	115,6 63-159	113,7 67-150	113,7 70-144	111,75 72-139	111,75 74-134	111,75 76-131	110,25 78-128	110,25 81-123	110,25 82-121
22	154,4 46-217	144,8 53-188	138,0 58-172	133,6 63-160	131,5 67-150	127,3 70-144	125,3 72-139	125,3 74-134	123,3 76-131	123,3 78-128	121,3 81-123	121,3 82-121
21	193,3 45,224	175,7 52-192	162,2 58-173	154,4 63-160	149,5 66-151	144,75 70-144	140,2 72-139	138,0 74-135	138,0 76-131	135,8 79-128	133,6 81-123	131,5 82-121
20	238,5 43-233	209,7 50-196	190,3 57-174	178,5 62-161	170,1 66-151	162,2 70-144	157,0 72-139	154,4 75-134	152,0 77-131	149,5 79-127	144,3 81-123	140,2 82-121
19	294,0 41-244	250,3 50-201	223,6 57-176	203,0 62-161	190,3 66-151	181,4 70-144	175,7 72-139	172,9 75-134	167,4 77-130	164,7 79-126	159,5 81-123	154,4 82,121
18	356,6 39-258	294,0 49-205	258,5 56-178	231,0 62-162	216,5 66-151	203,0 70-143	196,5 73-137	190,3 75-134	187,3 77-130	181,4 79-126	167,4 81-123	162,2 82-121
17	432,6 38-268	345,3 48-210	294,0 56-180	262,7 62-162	242,4 67-150	227,5 70-143	216,5 73-136	209,7 76-132	206,3 78-128	199,8 80-125		
16	516,5 36-279	399,1 47-214	339,8 55-181	298,7 62-162	271,2 67-150	254,6 71-141	238,5 74-134	231,0 77-131	227,5 79-127	209,7 81-124		
15	606,5 35-288	461,1 46-217	380,3 55-181	334,5 62-162	298,7 67-149	280,4 72-140	262,0 75-133	254,6 78-130	246,3 80-125			
14	712,3 34-294	524,8 46-218	425,7 55-181	368,2 63-160	329,1 68-147	303,6 73-137	289,3 76-131	280,1 79-126	250,3 81-124			
13	810,4 34-296	587,4 46-217	468,8 56-178	399,25 64-157	356,6 70-144	334,5 74-135	318,75 78-128	303,6 81-124				
12	908 34-295	647,6 47-213	508,6 57-175	432,6 65-154	386,5 71-140	356,6 76-131	345,3 81-124					
11	983 35-285	690,6 48-208	542 59-170	464,4 67-148	413,3 74-134	386,5 80-125						
10	1048 36-276	727,3 50-199	568,75 62-163	484,2 71-142	432,6 78-128							
9	1065 38-260	747,9 53-187	567,4 66-153	492 76-133								
8	1065 42-236	736,6 58-172	578 71-140									
7	999,25 48-208	691,25 68-153										
6	678,5 57-176											

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 МЕ 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 МЕ (табл. 6). При определении ED_{50} референс-препарата используют значение средней иммунизирующей дозы, выраженное в МЕ.

$$ED_{50}референс = \frac{71{,}3 \cdot 0{,}1}{100} = 0{,}0713\ ME,$$

$$ED_{50}макс. = \frac{0{,}0713 \cdot 139}{100} = 0{,}0991\ ME,$$

$$ED_{50}мин = \frac{0{,}0713 \cdot 72}{100} = 0{,}0513\ ME,$$

$$ED_{50}вакцины = \frac{111{,}75 \cdot 0{,}0071}{100} = 0{,}0079\ мл,$$

$$ED_{50}макс. = \frac{0{,}0079 \cdot 139}{100} = 0{,}011\ мл,$$

$$ED_{50}мин = \frac{0{,}0079 \cdot 72}{100} = 0{,}0057\ мл.$$

Количество МЕ в 1 мл вакцины определяют по формуле:

$$X = \frac{ED_{50}референс}{ED_{50}вакцины},$$

$$X = \frac{0{,}0713}{0{,}0079} = 9{,}0\ \text{МЕ/мл}.$$

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 $S_1 = (\lg ED_{50})_{\text{макс.}} - \lg ED_{50}$ для более иммуногенного препарата при избранном уровне существенности различия – 95 или 99%;

$S_2 = \lg ED_{50} - (\lg ED_{50})_{\text{мин.}}$ 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 (Хгеом.) величины значения по формуле:

$$\text{Хгеом.} = \sqrt[n]{\text{П}_\text{х}},$$

где $\text{П}_\text{х}$ – 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.

Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов **ОФС.1.7.2.0006.15**

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 °С, а затем при температуре от 20 до 25 °С. 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 вируссодержащей 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 °С. 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 испытуемой клеточной культуры оставляют по одному интактному (незараженному) контрольному флакону. Все культуры выдерживают при температуре (36 ± 1) °С 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 группо-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 лейкозо-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 ± 1) ºС 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 вируссодержащего 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 °С. При проведении контроля в более поздние сроки образцы замораживают и хранят при температуре не выше минус 20 °С. 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 ± 1) °С 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 ± 1) °С 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 - интраперитониально. 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 ± 1) °С 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 ^{o}С 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 ±1) °С 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 выявляется 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 ± 1) °С 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 инактивированных 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 высева 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 ± 1) °С. 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.

Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции	**ОФС.1.7.2.0007.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на реакцию флокуляции, которая предназначена для определения содержания анатоксинов или токсинов в растворах.

Реакция флокуляции по Рамону (Ramon assay) основана на способности некоторых антигенов при соединении со специфическими антителами образовывать нерастворимый комплекс «антиген–антитело», который визуально выявляется в виде помутнения среды и образования хлопьев (флокулята). Характерной особенностью реакции флокуляции является феномен инициальной флокуляции, т.е. способность формирования флокулята 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 флокуляционных тестов. За 1 Lf принимают количество анатоксина, которое вступает в реакцию флокуляции с 1 МЕ или 1 Lf-eq. антитоксина в наиболее короткий промежуток времени. Содержание токсина/анатоксина в растворе, определенное в реакции флокуляции, 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 ºС, периодически оценивая состояние растворов.

Результат реакции оценивают в проходящем свете, при необходимости применяют лупу. Отмечают пробирки, в которых раньше других произошла флокуляция, и время наступления флокуляции (Kf). Пробирка, в которой раньше других наблюдается появление хлопьев (инициальная флокуляция), содержит эквивалентные или близкие к эквивалентным количества антигена и антител. Для расчета содержания антигена учитывают концентрацию антитоксина в этой пробирке. Если инициальная флокуляция наблюдается одновременно в 2 пробирках, для расчета берут среднее значение показателей концентрации антитоксина, содержащегося в этих пробирках. Если перед проведением реакции флокуляции 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 флокуляция в пробирке № 3, следовательно, в этой пробирке содержание анатоксина близко или эквивалентно количеству внесенного антитоксина. В данном случае – 45 Lf/мл. Если испытуемый раствор был разведен в 10 раз, содержание анатоксина в нем равно 450 (45·10) Lf/мл. Если инициальная флокуляция 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 флокуляция, оказалась в середине ряда.

Для получения более точных результатов повторяют тест, выполняя реакцию флокуляции с объемами вносимого антитоксина, близкими по значению к эквивалентной концентрации, используя меньшие различия во вносимых объемах. Например: если инициальная флокуляция 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 флокуляции для растворов с низкой концентрацией анатоксинов/токсинов

Для растворов анатоксинов или токсинов с низкой концентрацией (менее 5 Lf/мл) предпочтительнее использовать метод смешанной флокуляции, 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 флокуляционными 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 МЕ/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 ºС, периодически оценивая состояние раствора. Отмечают пробирки с инициальной флокуляцией в каждом ряду. Разница значений показателей инициальной флокуляции обоих рядов указывает на содержание анатоксина в испытуемом растворе.

Определение концентрации микробных клеток ОФС.1.7.2.0008.15

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 высева 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 1мл 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;

$\mathrm{k} = \frac{1}{v} = \frac{1}{0{,}0009} = 1111$ – коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева (v=0,9 мм^3=0,9·10^{-3}мл);

b – разведение исходной взвеси микроорганизма.

При подсчете с использованием камеры Горяева необходимо соблюдать следующие основные правила:

– использовать только стандартные покровные 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 взвесях 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 МЕ 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 МЕ, 5 МЕ и 20 МЕ мутности соответственно, предназначены для стандартизации

бактериальных взвесей визуальным методом и обеспечения единства определения концентрации микробных клеток в бактериальных взвесях 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 туляремийных 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:

$$ОК = \frac{V_0 + V_i}{V_0} \cdot k,$$

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 ME (V_i = 1,0+0,2+0,3 = 1,5 мл). Концентрация туляремийных бактерий во взвеси (коэффициент k), соответствующей 10 ME, составляет $5{,}0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

$$\text{ОК} = \frac{0{,}5 + 1{,}5}{0{,}5} \cdot 5{,}0 \cdot 10^9 = 2{,}0 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ/мл}$$

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 бактерийных взвесях 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_2SO_4	1%$BaCl_2$		
0,5	9,95	0,05	$1 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
1	9,9	0,1	$3 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
2	9,8	0,2	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$
3	9,7	0,3	$9 \cdot 10^8$	9×10^8
4	9,6	0,4	$12 \cdot 10^8$	$12 \cdot 10^8$
5	9,5	0,5	$15 \cdot 10^8$	$15 \cdot 10^8$
6	9,4	0,6	$18 \cdot 10^8$	$18 \cdot 10^8$
7	9,3	0,7	$21 \cdot 10^8$	$21 \cdot 10^8$
8	9,2	0,8	$24 \cdot 10^8$	$24 \cdot 10^8$
9	9,1	0,9	$27 \cdot 10^8$	$27 \cdot 10^8$
10	9,0	1,0	$30 \cdot 10^8$	$30 \cdot 10^8$

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 высевов).

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:

$$\mathrm{N} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}} = 1{,}9 \cdot 10^{8}\ \text{КОЕ/мл.}$$

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) а 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**

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 дозе[1] 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 ± 2) °С.

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 ± 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 ± 0,2). Питательную среду разливают в пробирки по 10 , 25 или 30 мл и стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения готовой стерильной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или

не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Примечание

[а]) Приготовление печеночного экстракта с содержанием аминного азота (0,050±0,005) %.

- Печень говяжья 1,0 кг
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре (112±5) °С в течение (20±1) мин (процесс стерилизации валидируется).

Приготовление: 1,0 кг свежей говяжьей печени очищают от жира, пленок и протоков, нарезают кубиками размером (3×3×3) 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 бутыли и стерилизуют при температуре 120±2 °С в течение 15±1 мин. Срок хранения печеночного экстракта при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес или не более 3 мес при комнатной температуре.

[б]) Приготовление дрожжевого аутолизата с содержанием аминного азота (0,15±0,03) %.

- Дрожжи хлебопекарные 1000 г
- Вода питьевая 4000 мл
- Хлороформ 40 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин.

[в]) Приготовление гидролизата обезжиренного молока по Богданову.

- Молоко коровье пастеризованное, нежирное (pH 6,7±0,1) 1000 мл
- Панкреатин 1,0 г
- Хлороформ 5,0 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре (112 ± 5) °С 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 ± 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 ± 0,2). Питательную среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре (120 ± 2) ^{o}C в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 ^{o}C или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 ^{o}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 ± 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 (pH 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 (pH 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 pH (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) ^{o}C в течение (60 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется). Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 ^{o}C или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 ^{o}C . 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) ^{o}C 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 бутыли и стерилизуют при температуре (112 ± 5) ^{o}C в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения – не более 6 мес при температуре от 2 до 8 ^{o}C или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 ^{o}C.

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±5) °С в течение (20±1) мин. Срок хранения питательной среды 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Среда Гаузе №2 агаризованная

- Бульон Хоттингера[1)] 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 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды в течение 6 мес при температуре от 2 до 8 °С 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 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С

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 °С в течение (20 ± 1) мин. После стерилизации среда, остывая, уплотняется.

Срок хранения готовой среды (pH 7,3 ± 0,2) 6 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

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 °С в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

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 ± 1) °С 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±1)^{o}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) ^{o}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 ± 1) ^{o}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 ± 1) ^{o}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 анаэростат 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 ± 2,5 ^{o}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 ± 1) ^{o}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:

$(43{,}5 \cdot 10^7 + 430 \cdot 10^6) : 2 \ 10 = 4325000000 = 4{,}3 \cdot 10^9$.

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 $(38 \pm 1)\ ^0$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 ± 1) ^{o}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 ± 1) °С 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 ± 1) °С 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±1) ^{o}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 ± 1) ^{o}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 ± 1) °С 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 ± 1) °С. Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре (38 ± 1) °С 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 ± 1) °С. Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре (38 ± 1) °С 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 ± 1) °С стерильной пипеткой удаляют растопленный верхний слой жира;
- пробирки охлаждают при температуре от 2 до 8 °С 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 pH (8,5±0,1) (контролируют потенциометрически), при этом учитывают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование.

Учет результатов

Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т) и вычисляют по формуле:

$$^{o}T = A \cdot K \cdot 10,$$

где: *А* – количество миллилитров 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой микробной суспензии;

К – 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 *К* = 1,03, тогда:

$T = 10,6 \cdot 1,03 \cdot 10 = 109,18\ ^{o}T$

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
Staphylococcus aureus	ATCC 6538 (FDA 209P)
Escherichia coli	O157
Shigella flexneri	170, 337
Shigella sonnei	5063
Proteus mirabilis	H-237 или 56/10

Proteus vulgaris	177 или 401
Candida albicans	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 ± 2,5) ^{o}C, грибов – (22,5 ± 2,5) ^{o}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) ^{o}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) ^{o}C. Пробирки с суппозиториями помещают на водяную баню при температуре (39 ± 1) ^{o}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±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 ± 1) °С 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 ± 0,25) мм в направлении, перпендикулярном зоне роста изучаемого микроорганизма, и не касаясь его. Чашки Петри перевернутые вверх дном инкубируют при температуре (37 ± 1) °С 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**

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 (посевного вируса) и должны содержаться в непосредственной близости от опытных животных в течение всего периода наблюдения.

Производственный штамм (посевной 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. Вируссодержащий 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. Вируссодержащую 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 ± 0,3°С), 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) сильвиев 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 вируссодержащего 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).

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	V
		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	Поясничный отдел спинного мозга	П. о.

Таблица 2 – Протокол «Оценка интенсивности патоморфологических изменений в ЦНС обезьян, заражённых вирусом кори (краснухи)»

Вид обезьян Исследуемый вирус Титр при инокуляции
Дата 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**	**Х Х Х Х**	**Х Х Х**	**Х Х**	**Х**	**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 Исследуемый вирус Титр при инокуляции
Дата 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**	**ХХ**	**ХХХ**	**ХХ**	**Х**	**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 биологических лекарственных препаратов **ОФС.1.7.2.0011.15**

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 биологических лекарственных препаратов (БЛП) 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 БЛП.

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 БЛП 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 БЛП, получаемые из тканей животных и птиц, должны быть стерильными, жизнеспособными, морфологически однородными, неонкогенными, нетуморогенными и не содержать посторонних агентов.

При производстве БЛП 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 рассева, 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, CHO, 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 БЛП.

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 БЛП 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 ºС, затем до минус 70 ºС. 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 ^{o}С, окрашивают гематоксилин-эозином или азур-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 рассева, 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), нуклеозидфосфорилаза (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 принадлежит 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 ± 1) °С. 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 ± 1) °С. 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 °С. 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 ºС 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 аберраций 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 аберраций, число аберрантных клеток, типы аберраций и их частоту, распределение аберраций 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 флюоресценции 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 БЛП.

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 $V_{ср}$.по формуле:

$$V_{ср} = а \cdot \ в \cdot с,$$

где: а – длина, в – ширина, с - 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 ($ТПД_{50}$). Для расчета $ТПД_{50}$ изучаемые клетки вводят экспериментальным животным в дозах 10^7; 10^5; 10^3 и 10^1 и данные выражают как 50 % доза опухолеобразования ($ДОО_{50}$).

Изучение туморогенности в системе in vitro методом инвазивности в органные 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 ºС, 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 CO_2 при температуре 36 - 37 ºС.

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 органные культуры 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 БЛП.

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 БЛП составляло не более 10,0 нг;

– проводить валидацию методов инактивации и очистки инактивированных препаратов, которые должны обеспечивать дефрагментацию и снижение количества гетерогенной ДНК в БЛП;

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 высевают 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, цирковирусов 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.

Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков **ОФС.1.7.2.0012.15**

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 невирулентными, 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 ил 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 1ампуле/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 волютина; 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, лицитиназа 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* АТСС 6538-Р.

Отрицательный контроль – тест-штамм: *E. faecalis* ССМ 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-P 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 ± 1) °С 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 °С в течение 15 мин. Основа среды бледно-желтого цвета. К охлажденной до температуры 50– 55 °С 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 лецитиниазы 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– 55 °С основе (солевому агару) добавляют 150 мл желточной взвеси. Готовую среду разливают в чашки Петри.

2.1.3 Определение плазмокоагулазной 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 ± 1) °С 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* АТСС 6538-Р.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* АТСС 14990.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать плазмокоагулазу.

2.1.4 Определение фибринолитических свойств

Методика исследования основана на способности микроорганизмов, обладающих фибринолизином, 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 ± 1) °С. 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 контро*ль* – *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 ± 1) °С на чашках Петри с МПА. Выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида (3 мл на 1 чашку), автоклавируют 15 мин при температуре 120 °С и хранят при температуре от 2 до 8 °С. 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±1) °С 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 гемолизирующих 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* АТСС 6538-Р; *S.aureus* 0-15.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* АТСС 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* АТСС 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* АТСС 14990.

Для получения изолированных колоний делают посев штрихом 18-часовой исследуемой культуры. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С 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 °С 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 °С.

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 (pH 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 фотопленки, помещенной в пробирку с исследуемой культурой.

Полоски фотопленки 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 фотопленки так, чтобы верхняя часть ее оставалась не погруженной в среду. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С. 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 посевы оставляют в термостате до 7 сут.

Положительный контроль – *Proteus mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24а; *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 № Р-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 (pH 7,0 – 8,0). Раствор подогревают до температуры (55 ± 0,5) °С 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±1) °С 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 °С (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 ± 1) °С в течение 18–24 ч, высевают штрихом на агаризованную среду с твином-20 и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С 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 (pH 7,4 – 7,6). Твин-20 нагревают на водяной бане до температуры (55 ± 5) °С 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 ± 1) °С в течение 5 сут. О разложении аргинина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

Положительный контроль – *S. aureus* 6538-Р АТСС.

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 ± 1) °С 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 ^{0}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 ± 4) ^{0}C в герметично укупоренных емкостях из темного стекла. Срок годности 2–3 мес.

3.7 Реакция Фогеса–Проскауэра

Некоторые микроорганизмы при сбраживании глюкозы способны образовывать ацетоин (ацетилметилкарбинол), который выявляют в реакции Фогеса–Проскауэра.

Для постановки реакции Фогеса–Проскауэра культуру выращивают на среде Кларка при температуре (37 ± 1) °C в течение 24–72 ч. Затем к 1 мл микробной культуры добавляют 0,6мл 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 мочевину с образованием аммиака и углекислоты. Это приводит к изменению pH среды до щелочных показателей. О наличии уреазы у бактерий судят по покраснению среды, содержащей мочевину.

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 мочевину, вносят 1 петлю суточной культуры, выращенной на МПА, инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Изменение окраски среды с желтой до

розово-красной свидетельствует о наличии фермента уреазы и способности испытуемой культуры гидролизовать мочевину.

Положительный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24а, *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 °С (1,5 атм) в течение 30 мин. Охлажденный до температуры (50 ± 5) °С 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 высевают на чашки штрихом и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С 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* 24а, *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* 24а, *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 синеет). 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 Сквашивающая 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 (°Т), 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 (pH 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 (pH 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 ± 1) °С 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 инактивированные 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± 1) °С.

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 высева 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 ± 2) °С. 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, тинкториальным, 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 создании 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, pH 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 (*К* %), 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:

$$ИАМ = (СПА\ 100\ \%) / К,$$

где СПА – средний показатель адгезии испытуемого микроба;

К – 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 (pH 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 ± 1) °С 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 раздельном 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 ложкообразными 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 $(1,5–2)\cdot10^6$ клеток/мл.

Далее готовят суспензию испытуемого штамма с концентрацией $2\cdot10^9$ 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 ± 1) °С в течение 30 мин, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от неприлипших микробов при 600 об/мин по 10 мин. Все манипуляции осуществляют на холоде. К осадку добавляют 1– капли ЗФР 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, дермонекротические 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 ±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 дермонекротических 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 дермонекротической 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 LD_{50} или максимально переносимой дозы однократно животным вводят несколькими способами (внутривенно, внутрибрюшинно, 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 внутрибрюшинные 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
Внутрибрюшинное 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	Максимально переносимая доза	Однократно	7 с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	1 и 7

4.3. Определение «хронической» токсичности испытуемых 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 ($Э_д$) на кг массы тела животного, рассчитывают по формуле: $Э_д = М_ж \cdot ЧД/М_ч$,
где $М_ж$ – масса тела животного;

ЧД – человеческая доза;

$М_ч$ – масса тела человека (масса тела взрослого человека 70 кг, масса тела ребенка – 10 кг).

Пример расчета: $М_ж$ = 10г; $М_ч$ = 10кг = $1·10^4$ г; ЧД = $1·10^9$ КОЕ/г

$Э_д = 10\ 1·10^9/1\ 10^4 = 1·10^6$ 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°С
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, миоцитолиз, 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 ОФС.1.7.2.0013.15

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°С). 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 (достраивание) 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 электофореза 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 флюоресцентные зонды (например, система TaqMan). В первом варианте флюоресцентный краситель связывается с синтезируемой двухцепочечной ДНК с возникновением флюоресцентного 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**

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 l, не равным нулю. Практическое значение с точки зрения распространённости и чувствительности имеет наблюдение ЯМР на ядрах ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F и ^{31}P. Все перечисленные магнитно-активные ядра имеют спин, равный ½. 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 (ЯМР ^{13}C) в контролируемых условиях. Спектроскопия ЯМР на ядрах ^{1}H 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: полиноминальная.

Критерии пригодности спектров ЯМР ^{13}C для анализа:

Отношение сигнал/шум: ≥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 D_2O, добавляют 120 мкл 1,4-диоксана и перемешивают.

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

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 группы биологических лекарственных препаратов (БЛП).

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 $\boldsymbol{k}$ ($1 \leq \boldsymbol{k} \leq 10$) 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 (≈ 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 ± (0,1 – 0,2) ^{o}C.

Анализ вспомогательных веществ

Метод ОФ ВЭЖХ используется также для определения содержания в препаратах цитокинов и интерферонов таких вспомогательных веществ, как маннит, бензиловый спирт, *м*-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 аминогруппы.

При определении содержания маннита, полисорбата-80, *м*-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 (pH

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.

Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0016.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, предназначенный для количественного определения ионов алюминия комплексонометрическим методом в сорбированных биологических лекарственных препаратах (БЛП). 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 необходимое количество исследуемого образца и вносят в колбу из термостойкого стекла вместимостью 100 мл, прибавляют 4-5 мл 5 % раствора серной кислоты и перемешивают.

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 и

10 мл точно отмеренного 0,01 М раствора трилона Б, перемешивают и нагревают до кипения. После охлаждения раствора до комнатной температуры прибавляют 25 мл 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 (Х) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K_{ZnSO_4} \cdot (V - V_0) \cdot 0{,}2698}{V_n};$$

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

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:

$$K_{ZnSO_4} = 10 / V_k,$$

где: 10 – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, взятый на титрование контрольного раствора, в мл;

V_k – объем 0,01 М раствора цинка сульфата, пошедший на титрование контрольного раствора, в мл.

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.

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.

Приготовление раствора дитизона. Растворяют 25 мг дитизона в 100 мл ацетона, перемешивают и хранят при температуре 4 - 8 С в течение 1 мес.

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.

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.

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.

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 биологических лекарственных препаратах	**ОФС.1.7.2.0017.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения фосфора с помощью спектрофотометрии в биологических лекарственных препаратах (БЛП). 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 испытуемых образцов БЛП 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 х 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 (Х) в 0,5 мл исследуемого образца в микрограммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 0{,}5}{B};$$

где: А – количество фосфора, найденное по калибровочному графику; в мкг,

В – 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

Приготовление испытуемого раствора. Содержимое каждого флакона (ампулы) растворяют в 0,5 мл растворителя (вода очищенная).

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.

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.

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.

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.

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.

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 объём раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через два слоя фильтровальной бумаги и хранят в склянке из тёмного стекла с притёртой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Приготовление 10 % раствора аскорбиновой кислоты. В мерный цилиндр вместимостью 20 мл помещают 2 г аскорбиновой кислоты и растворяют в воде очищенной, затем объём раствора доводят до метки и перемешивают. Раствор готовят в день проведения анализа.

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 биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0018.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения суммарного количества нуклеиновых кислот в биологических лекарственных препаратах (БЛП). Определение количества нуклеиновых кислот проводится спектрофотометрическим методом после проведения кислотного гидролиза.

Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности гидролизатов БЛП 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, 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 БЛП должно составлять от 15 до 35 мкг/мл.

Примечания

Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого образца или приготовленного, как указано в фармакопейной статье и нормативной документации.

0,5 М раствор хлорной кислоты. Раствор готовят с учетом удельного веса и процентной концентрации исходного раствора хлорной кислоты.

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°С в течение 12 мес.

Определение О - ацетильных групп в полисахаридных вакцинах ОФС.1.7.2.0019.15

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;

B – 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 иодистого (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 иодистого в мкмолях О-ацетильных групп, а по оси ординат–показания оптической плотности стандартных растворов при 540 нм.

Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания

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.

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.

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.

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.

Реактив 1. Смешивают равные объемы 1 М раствора гидроксиламина и 3,5 М раствора натрия гидроксида. Реактив готовят в день проведения анализа.

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.

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.

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 pH 4,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Раствор хранят при температуре 4 – 8 ^{0}С в течение 3 мес.

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.

Определение бычьего сывороточного альбумина в биологических лекарственных препаратах методом ракетного иммуноэлектрофореза **ОФС.1.7.2.0020.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения бычьего сывороточного альбумина в биологических лекарственных препаратах (БЛП). 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 ºС 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 ± 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.

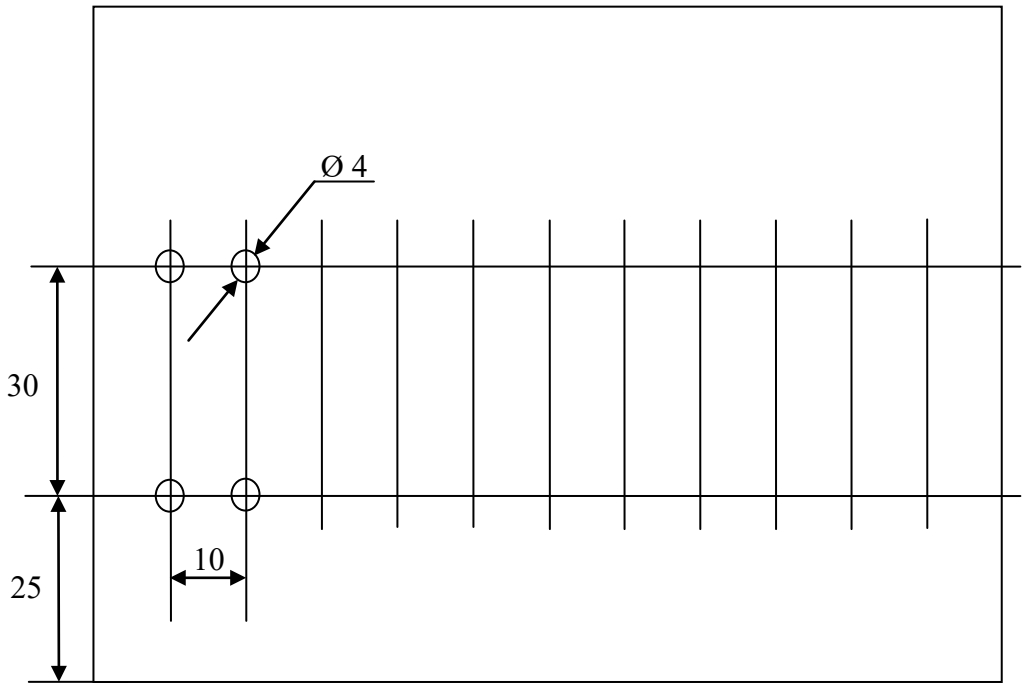


Рисунок 1–Трафарет для ракетного иммуноэлектрофореза (размеры указаны в мм)

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 ºС. 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 ºС. 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).

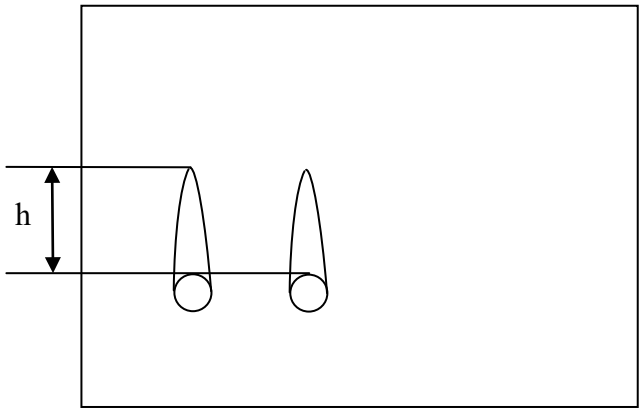


Рисунок 2. Измерение высоты пика «ракеты»

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

Испытуемый образец – 15 мкл испытуемого образца.

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 адъюванта 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 циклаII 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 ± 1) ºС на 60–65 мин, затем обводят образовавшийся сгусток пипеткой и

оставляют при температуре 4 – 8 ºС 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 ºС в течение 2 лет.

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 – 8ºС не более 3 мес.

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 ºС не более 1 мес при 4-кратном использовании.

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 ºС не более 2 мес.

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.

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.

Подготовка стеклянных пластинок. На стеклянные пластинки размером 120 х 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

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 (Δ pI) компонентов, определяют по формуле:

$$\Delta pI = 3 \text{ x } \sqrt{\frac{D(\frac{dpH}{dx})}{E-(\frac{du}{dpH})}},$$

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 pH 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 ^{0}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 (тетраметилендиамина) 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 ^{0}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 полоску смачивают анодным буферным раствором и помещают на анодный конец геля (маркировка (+) на охлаждающей пластине). Вторую электродную полоску 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 близи 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 сфокусированный 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 ^{0}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 мочевину. 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 биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот **ОФС.1.7.2.0022.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод вестерн-блот, один из вариантов иммуноблоттинга, который используют для оценки подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов (БЛП) 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 мА/см^2, (например, для геля размером 10х10см^2 A_{max}= 200 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 визуально 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 (ТМВ) 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 валидация 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

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 ^{0}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.

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 ^{0}С.

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.

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.

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.

Раствор ТМВ – раствор для проявления пероксидазы хрена. Используют ТМВ-субстрат, готовый к применению.

Раствор для проявления щелочной фосфатазы. Растворяют 1 таблетку субстрата BCIP/NBT в 10,0 мл деионизованной воды. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

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

Настоящая фармакопейная статья предназначена для определения белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах (БЛП) с использованием стандартного образца. Общие принципы метода, требования к стандартному, контрольному и испытуемому образцам изложены в ОФС «Определение белка».

Для определения белка в биологических 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 биологических лекарственных препаратах (БЛП), 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

Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,04 до 0,16 мг/мл белка.

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 БЛП, 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 ^{0}С в течение 18 - 20 ч. Осадок отделяют центрифугированием при температуре 4 - 8 ^{0}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

Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого раствора, содержащий от 0,1 до 0,13 мг/мл белка.

Приготовление реактива В указано в ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).

Приготовление 10 % и 20 % растворов трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворы готовят соответствующим разведением 80 % раствора ТХУ.

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.

Приготовление фосфорномолибденово-вольфрамового реактива. Перед использованием 2 N фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив (2 N коммерческий реактив Фолина-Чокальтеу) 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 ^{0}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 ^{0}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

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.

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 ^{0}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 ^{0}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

Испытуемый раствор. 2 мл испытуемого раствора с содержанием белка от 0,01 до 0,02 мг/мл.

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 указанно 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.

Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах	**ОФС.1.7.2.0024.18** **Взамен ОФС.1.7.2.0024.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения формальдегида в биологических лекарственных препаратах (БЛП) в реакциях взаимодействия формальдегида с фуксинсернистым реактивом или с ацетилацетоном колориметрическим методом.

Метод с фуксинсернистым реагентом основан на образовании хиноидного красителя малинового окрашивания при его взаимодействии с водорастворимыми альдегидами позволяет определять содержание формальдегида в БЛП в диапазоне от 20 до 80 мкг/мл в пробе. Метод А.

Метод с ацетилацетоновым реагентом основан на образовании соединения желтого окрашивания при его взаимодействии с формальдегидом в присутствии ионов аммония, позволяет определять содержание формальдегида в БЛП в диапазоне от 2 до 20 мкг/мл в пробе. Метод В.

Интенсивность окраски образующихся соединений пропорциональна содержанию формальдегида в испытуемом образце.

Определение формальдегида с фуксинсернистым реактивом (Метод А)

Для анализа готовят две параллельные пробы испытуемого образца.

В химические пробирки отбирают 0,5 – 2,0 мл (в зависимости от содержания формальдегида) надосадочной жидкости сорбированного образца (испытуемый образец сорбированного лекарственного препарата

предварительно центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин) 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. 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

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).

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, образующий коричнево-красное окрашивание раствора, титруют 0,1N раствором натрия тиосульфата до появления соломенно-желтого окрашивания, затем 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:

$$X_2 = \frac{(а - б) \cdot К \cdot 0{,}001501 \cdot 100^* \cdot 100}{5{,}0}$$

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 – поправочный коэффициент 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.

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.

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 сут.

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.

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.

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.

Определение формальдегида с ацетилацетоном (Метод В)

Для анализа готовят две параллельные пробы испытуемого образца. 2 мл надосадочной жидкости сорбированного (испытуемый образец сорбированного лекарственного препарата предварительно центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин) или несорбированного испытуемого образца с содержанием формальдегида от 2 до 20 мкг/мл помещают в химическую пробирку, добавляют 2 мл ацетилацетонового реагента, закрывают пробкой, перемешивают и выдерживают на водяной бане при температуре 40 ^{0}С в течении 40 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность испытуемого образца при 400 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 2 мл воды очищенной и 2 мл ацетилацетонового реагента. Испытуемый образец сорбированного лекарственного препарата предварительно центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин.

Концентрацию формальдегида в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot n}{b},$$

где: a - количество формальдегида в пробе, найденное по калибровочному графику, в мкг;
n – коэффициент разведения;
b –объем испытуемого образца, взятый на анализ, мл.

Построение калибровочного графика. Калибровочные растворы готовят, используя стандартный раствор формальдегида, с концентрацией 20 мкг/мл (раствор № 2), приготовленный из основного раствора формальдегида с учетом титра данного раствора (около 4 мг/мл, раствор № 1) (табл).

Таблица – Стандартные растворы с концентрацией формальдегида 1 -20 мкг/проба

Концентрация формальдегида в калибровочном растворе; мкг/проба	Объем стандартного раствора формальдегида «20 мкг/мл»; мкл	Объем воды очищенной; мкл
1	50	1950
2	100	1900
4	200	1800
8	400	1600
16	800	1200
20	1000	1000

В каждую пробирку с калибровочным раствором соответствующей концентрации прибавляют воду очищенную до объема 2 мл и перемешивают, добавляют 2 мл ацетилацетонового реагента и вновь перемешивают. Далее анализ проводят, как указано выше для испытуемого образца. Калибровочную кривую строят, откладывая по оси абсцисс значения концентраций, по оси ординат – значения оптической плотности калибровочных растворов. Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

Примечания

Испытуемый раствор. На анализ отбирают 2 мл испытуемого образца, если нет иных указаний в нормативной документации (количество формальдегида в анализируемом образце должно быть в пределах 2 -20 мкг).

Основной стандартный раствор формальдегида с содержанием около 4 мг/мл. (раствор №1). Методика приготовления указана в методе А.

Стандартный раствор формальдегида 20 мкг/мл (раствор № 2). Методика приготовления указана в методе А.

Ацетилацетоновый реагент. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 150 г аммония ацетата, добавляют 3 мл уксусной кислоты ледяной, 700 мл воды, перемешивают и измеряют pH (5,5-6,5), затем прибавляют 2 мл ацетилацетона, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Реагент хранят в течение 1 г при температуре 2 -8 °С.

Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах	**ОФС.1.7.2.0025.18** **Взамен ОФС.1.7.2.0025.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения тиомерсала в биологических лекарственных препаратах (БЛП) методами: колориметрическим**,** полярографическим, методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (ЭААС) и методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП).

Указанные методы предназначены для определения содержания тиомерсала в сорбированных и несорбированных БЛП.

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 спектрометрии (ЭААС) для определения тиомерсала в БЛП 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.

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП).для определения тиомерсала в БЛП вводится впервые. Метод атомно-

абсорбционной спектроскопии холодного пара основан на восстановлении ртути с помощью сильного восстановителя до атомарного состояния. Атомарная ртуть выделяется в виде паров и способна поглощать (абсорбировать) излучение световых потоков при длине волны 253,7 нм. При этом абсорбция световых потоков прямо пропорциональна концентрации ионов ртути в испытуемом образце. Содержание ртути в исследуемом образце определяется по калибровочному графику с пересчетом на тиомерсал.

Содержание тиомерсала, определяемое указанными методами в БЛП, 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 помешивания 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 гидроксиламина 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: а – 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.

Содержание тиомерсала в БЛП не должно превышать 20-120 мкг/мл.

Примечания

Испытуемый раствор. 0,2 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

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.
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).
Стандартные образцы (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах» с различным диапазоном содержания тиомерсала в пределах от 20 до 120 мкг/мл.
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.
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 ± 0,05.
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.
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.

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.

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.

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.

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.

Приготовление 10 % раствора квасцов железоаммонийных. В 90 мл воды растворяют 10 г квасцов железоаммонийных 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:

$$X_3 = \frac{\alpha \cdot 5{,}0}{4{,}5};$$

где:

а – 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 (OY), а на оси абсцисс (OX) – 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».

Примечания

Испытуемый раствор – 4,5 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

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.

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.

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 спектрометрии

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 спектрометрии может быть применим и для анализа остаточного содержания тиомерсала в БЛП.

Примечания

Испытуемый раствор**.** Испытуемый раствор разводят водой очищенной, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

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.

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.

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.

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП)

Основными стадиями метода атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара являются:

1. Минерализация – испытуемый образец минерализуют в кислой среде в присутствии окислителя (например, калия перманганата); в результате данного процесса ртуть переходит в ионную форму с образованием ионов ртути (II).

2. Восстановление – образец, содержащий ионы ртути (II), смешивают с восстанавливающим агентом (например, раствором олова (II) хлорида). В результате окислительно-восстановительной реакции, ионы ртути (II) восстанавливаются до атомарного состояния (Hg^0) по следующей схеме:

$$Hg^{2+} + Sn^{2+} \rightarrow Hg^0 + Sn^{4+}$$

3. Детектирование – потоком инертного газа (например, аргона) восстановленная ртуть переносится в оптическую ячейку, где происходит измерение абсорбции излучения атомами ртути с длинной волны 253,7 нм.

На определение отбирают 0,025 мл испытуемого раствора и помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 0,15 мл 50 % раствора серной кислоты, разбавленной по объему, 0,7 мл 5 % раствора калия перманганата, перемешивают и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем

добавляют 0,2 мл 20 % раствора гидроксиламина сульфата, перемешивают, доводят объем раствора 3 % раствором хлористоводородной кислоты, разбавленной по объему до метки, и вновь перемешивают.

Анализ испытуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации оборудования с системой проточно-инжекционного типа, зарегистрированного в Государственном реестре средств измерений России. В процессе измерения аликвота образца отбирается из общего объема реакционной смеси автоматической системой прибора, смешивается в сепараторе с восстанавливающим реагентом (раствор олова (II) хлорида) и далее образовавшиеся пары ртути переносятся в измерительную ячейку, где происходит измерение поглощения излучения световых потоков атомами ртути при 253,7 нм.

Измерение испытуемых образцов проводят в 3-х повторностях в следующей последовательности: вода очищенная (используется в качестве контрольного раствора), калибровочные растворы (в порядке увеличения измеряемой концентрации) и испытуемый образец.

Содержание ртути в испытуемом образце (среднее значение) в мкг/мл вычисляют по калибровочному графику с помощью программного обеспечения к прибору.

Количество тиомерсала (С) в мкг/мл вычисляют по формуле:

$$C = \frac{X \cdot A \cdot 100}{N \cdot 49{,}55 \cdot 1000},$$

где:

X – количество ионов ртути, найденное по калибровочному графику, мкг/л;

N –объем испытуемого образца, мл;

A – конечный объем реакционной смеси, мл;

1000 – пересчет количества ртути на 1 мл;

100/49,55 – коэффициент пересчета ртути на тиомерсал.

Построение калибровочного графика. Отбирают 2,5; 12,5; 25; 37,5; 50 мкл стандартного раствора ионов ртути (10 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 25 мл, добавляют 20 мл 3 % раствора хлористоводородной кислоты и каплю 5 % раствора калия перманганата, доводят объем раствора до метки 3 % раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают. Концентрации ионов ртути (II) в указанных растворах соответственно: 1,0; 5,0; 10; 15; 20 мкг/л. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество ртути в мкг/л, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности атомного пара ртути. Измерения проводят, как указано выше. Калибровочный график воспроизводится при каждом определении.

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП) может быть применим и для анализа остаточного содержания тиомерсала в БЛП.

Примечания

Испытуемый раствор: 0,025 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Приготовление 3% раствора хлористоводородной кислоты: В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 700 мл воды очищенной, добавляют 30 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают и доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.

Приготовление 50 % раствора кислоты серной. (см. Примечания колориметрического метода, п.9).

Приготовление 5% раствора калия перманганата. (см. Примечания колориметрического метода, п.5).

Приготовление 20% раствора гидроксиламина сульфата. (см. Примечания колориметрического метода, п.7).

Приготовление стандартного раствора ионов ртути (10 мкг/мл): стандартный раствор ионов ртути (II) готовят, используя стандарты ионов ртути для ААС или ГСО (1 г/л): в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1мл ГСО, доводят объем раствора 3% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

Приготовление восстанавливающего реагента 1,1% раствор олова хлорида в 3% растворе хлористоводородной кислоты. В мерную колбу, вместимостью 1000 мл вносят 100 мл воды очищенной и постепенно при постоянном помешивании добавляют 11 г олова (II) хлорида, затем

добавляют 30 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, перемешивают, доводят объем водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

Приготовление и количество испытуемого образца, соотношение реагентов и объем реакционной смеси, и другие реактивы могут быть изменены в зависимости от модели используемого оборудования.

Методы оценки качества тиомерсала

О-этилртутьтиосалицилат натрия М.м. 404,8 $C_9H_9H_gNaO_2S$

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 свежепрокипяченой 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 2М 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 биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0026.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения белкового азота в биологических лекарственных препаратах (БЛП). 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 ºС. 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 Несслера и вновь перемешивают. Измеряют оптическую плотность, как указано выше. В качестве контрольного раствора используют 9,5 мл воды очищенной и 0,5 мл реактива Несслера. 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: 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 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

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).

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.

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.

Стандартный образец (СО) «Содержание белкового азота».

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 (Х) в % в анализируемом растворе вычисляют 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:

$$X = \frac{a \cdot 5^{а}}{5^{б} \cdot 1 \cdot 1000} = \frac{a}{1000},$$

где: а – количество азота, рассчитанное по калибровочному графику, мкг;

$5^{а}$ – разведение минерализата, мл;

$5^{б}$ – 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

Основной стандартный раствор аммония сульфата 0,1 мг/мл (раствор №1). Приготовление указано в методе А**.**

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°С в колбе с притертой пробкой в течение 3 мес.

Приготовление 80 % растворТХУ. 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 биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0027.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения общего азота в биологических лекарственных препаратах (БЛП). 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 ºС. 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.

Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах	**ОФС.1.7.2.0028.18** **Взамен ОФС.1.7.2.0028.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения фенола в биологических лекарственных препаратах (БЛП) спектрофотометрическим методом и методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Спектрофотометрический метод

Спектрофотометрический 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.

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:

$$\frac{a \cdot 100}{a}$$

$$X = \frac{a \cdot 100}{1000} = \frac{a}{10},$$

где: а – количество фенола, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;
100 – разведение испытуемого раствора;
1000 - пересчет в мг.

Содержание фенола в биологических лекарственных препаратах (БЛП) 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
Приготовлние испытуемого раствора. К 0,1 мл испытуемого образца добавляют 9,9 мл воды очищенной и перемешивают.
Приготовление основного стандартного раствора 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.
Приготовление стандартного раствора 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.

Метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Для определения содержания фенола в БЛП необходимо соблюдать следующие хроматографические условия:

- Колонка с неподвижной фазой C_{18};

- Подвижная фаза: смесь ацетонитрила или метанола с ледяной уксусной кислотой;

- Температура колонки: 20 - 25^{0}С;

- УФ детектор – длина волны 269 нм или 270 нм;

- Скорость потока – в зависимости от параметров хроматографической колонки (рекомендуемая величина – 0,8 – 1,2 мл/мин)

Порядок проверки пригодности хроматографической системы

Для проверки пригодности хроматографической системы вводят следующие пробы: 20 мкл разводящего раствора (1 инжекция), по 20 мкл рабочего стандартного раствора фенола 0,1 мг/мл (6 инжекций).

Хроматографическая система считается пригодной при соблюдении следующих условий:

1. хроматограмма разводящего раствора («холостой» опыт) не должна содержать пики, перекрывающиеся с пиками определяемого вещества;
2. относительное стандартное отклонение площади пика фенола в 6 измерениях должно быть не более 3%;
3. коэффициент асимметрии пика фенола должен быть не более 2;
4. число теоретических тарелок пика фенола должно быть не менее 5000.

Порядок измерений

Проводят измерения проб в следующей последовательности: рабочие стандартные растворы фенола 10; 20; 30 мкл (отбор проб в хроматографической системе производится автоматически и при введении стандартных образцов количество фенола изменяется за счет изменения объема). Затем вводят 20 мкл испытуемого раствора. Измерения всех испытуемых проб проводят в двух повторностях. Для вычисления содержания фенола используют среднее значение.

Содержание фенола (X) в испытуемом образце в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S - b}{a} \cdot 25,$$

где:

S - значение площади пика фенола на хроматограмме испытуемого раствора, найденное по графику;

b - свободный коэффициент уравнения регрессии;

a - угловой коэффициент уравнения регрессии;

25 - степень разведения испытуемого образца.

Построение калибровочного графика. Для определения отбирают 10; 20; 30 мкл рабочего стандартного раствора фенола (0,1 мг/мл) с ожидаемым содержанием фенола 0,05; 0,1 и 0,15 мг (точное значение количества фенола рассчитывают с учетом навески, взятой для приготовления основного стандартного раствора фенола). Проводят измерения в последовательности, указанной выше. Строят график регрессионной зависимости площади пика от концентрации фенола с помощью программного обеспечения к прибору.

Метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применим для БЛП с содержанием фенола от 1 до 4,0 мг/мл.

Примечания

1. Приготовление испытуемого раствора. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора образца, доводят объем раствора до метки водой очищенной или другим растворителем, указанным в нормативной документации, и перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут при комнатной температуре.
2. Приготовление 0,5% раствора уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл, вносят 700 мл воды очищенной, добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.
3. Приготовление разводящего раствора (подвижная фаза): Ацетонитрил для ВЭЖХ разводят 0,5% раствором уксусной кислоты в соотношении 1:4.
4. Приготовление основного стандартного раствора фенола (1 мг/мл). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 60 мл разводящего раствора, добавляют 0,1000 г (точную навеску) фенола и перемешивают, затем доводят объем раствора до метки тем же раствором и вновь перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут при комнатной температуре.

Приготовление рабочего стандартного раствора фенола (0,1 мг/мл). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мл основного стандартного раствора фенола, доводят объем раствора разводящим

раствором до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут при комнатной температуре.

Количественное определение 2-феноксиэтанола спектрофотометрическим методом в биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0029.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод предназначенный для определения 2-феноксиэтанола в биологических лекарственных препаратах (БЛП).

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

Испытуемый раствор. 1 мл испытуемого сорбированного образца или 0,1 мл испытуемого несорбированного образца.

Основной стандартный раствор 2-феноксиэтанола – 99,7 %, плотность – 1,1 г/мл.

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.

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

Испытуемый раствор**.** 1 мл раствора испытуемого сорбированного образца или 0,1 мл раствора испытуемого несорбированного образца.
Основной стандартный раствор 2-феноксиэтанола – 99,7 %, плотность – 1,1 г/мл.
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.
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.

Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах **ОФС.1.7.2.0030.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах (БЛП) 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 ($NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$).

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:

$Cl^- + Ag^+ = \downarrow \underline{AgCl} + Ag^+$ (избыток)

Ag^+ (избыток) + $SCN^- = \downarrow \underline{Ag\ SCN}$

$Fe^{3+} + 3\ SCN^- = [\ Fe(\ SCN)_3\ ]$

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 коричневато-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:

$$X = \frac{(V_к - V_{оп}) \cdot K \cdot 0{,}0003544}{A} \cdot 100,$$

где: $V_к$ – объем 0,01 М раствора аммония тиоцианата, пошедший на титрование контрольного раствора, мл;
$V_{оп}$ – 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

Приготовление испытуемого раствора – указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

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 ºС 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.

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.

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 железоаммонийных и титруют приготовленным раствором аммония тиоцианата до появления светлой жидкости коричневато-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.

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.

Приготовление насыщенного раствора квасцов железоаммонийных. В 100 мл воды очищенной растворяют 40 г квасцов железоаммонийных, 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.

Определение поправочного коэффициента к молярности аммония тиоцианата. Поправочный коэффициент определяют как отношение теоретически заданного объёма титранта (5 мл) к его объёму в контрольном эксперименте ($5/V_к$). Показатель поправочного коэффициента должен находиться в пределах ($1 \pm 0{,}02$).

Испытание на присутствие микоплазм ОФС.1.7.2.0031.15

Настоящая общая фармакопейная статья описывает испытание на присутствие микоплазм посевных (исходных) клеток, клеточных культур 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 вспомогательные материалы (трипсин, сыворотка крови животных и др.).

Условия проведения испытания

Испытание на присутствие микоплазм проводят при соблюдении всех правил асептики, в условиях, не оказывающих влияния на выявляемые микроорганизмы и исключающих контаминацию испытуемого образца.

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 флюоресцирующего красителя ДНК.

Испытание посевных (исходных) клеток, клеточных культур мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур

проводят двумя методами – микробиологическим и методом индикаторной клеточной культуры.

Испытание посевного и рабочего вирусных банков, вирусного сбора, готового препарата до розлива и готовой формы препарата на присутствие микоплазм проводят микробиологическим методом.

Для выявления ДНК Mycoplasma species (spp) может быть использован альтернативный метод – метод полимеразной цепной реакции при условии проведения соответствующей валидации.

Микробиологический (культуральный) метод

Микробиологический (культуральный) метод испытания на присутствие микоплазм может быть выполнен по следующим схемам:

Схема 1 – прямой посев испытуемого образца на полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3% агара (среда Каган полужидкая), с последующим инкубированием посевов при температуре (37 ± 1) ^{o}C в течение 14 сут.

Схема 2 – посев испытуемого образца в жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая), предварительное инкубирование в течение 5-7 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C с последующим псевом на полужидкую питательную среду, содержащую 0,3 % агара и инкубирование в течение 14 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C.

Учет результатов при проведении испытаний по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок

Питательные среды

Для проведения испытания на присутствие микоплазм используют полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм, содержащую 0,3 % агара (среда Каган полужидкая).

Жидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган жидкая) используют как вспомогательную для накопления микоплазм.

Для подтверждения наличия микоплазм используют плотную питательную среду, содержащую 1,3 % агара (среда Каган плотная).

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 – 13,0 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 1,0 л среды);
- Натрия хлорид – 5,0 г;
- Вода очищенная – до 1,0 л.
  Значение pH готовой среды после стерилизации (7,8±0,1).

Для приготовления полужидкой среды, содержащей 0,3% агара, вносят 3,0 г агара микробиологического на 1,0л среды. Для приготовления плотной среды, содержащей 1,3 % агара, вносят 13,0 г агара микробиологического на 1,0 л среды.

Приготовление питательных сред. Смешивают гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарных дрожжей, натрия хлорид и воду очищенную. Для приготовления полужидкой или плотной среды дополнительно вносят 3,0 г или 13,0 г агара соответственно. Доводят pH среды до (8,1 ± 0,1) 10 % раствором натрия гидроксида. Среду нагревают до кипения, кипятят 2-3 мин и при необходимости фильтруют. С помощью 5 % раствора хлористоводородной кислоты устанавливают pH (7,8 ± 0,1).

Среды разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 110^{o}C в течение 30 мин. Готовые среды хранят при температуре от 2 до 8 ^{o}C не более 4 мес.

Стерильность питательных сред. Каждая партия питательной среды должна быть проверена на стерильность. Образцы сред в количестве определенном в соответствии с ОФС 1.1.0004.15. «Отбор проб» инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) ^{o}C и (22,5 ± 2,5) ^{o}C в течение не менее 14 сут . Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

Подготовка сред для проведения испытания.

Перед применением полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара, и плотную среды, содержащей 1,3 % агара, нагревают на водяной бане до

полного расплавления и охлаждают до температуры 40–45 °С. Добавляют 15–20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно отконтролированной на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

Во все готовые питательные среды вносят стерильный раствор аргинина до конечной концентрации 1 % и стерильный раствор глюкозы до конечной концентрации 1 %. В жидкую среду Каган вносят 5,0 мл (0,6 г/л) стерильного раствора фенолового красного в качестве индикатора роста микоплазм.

Готовую жидкую и полужидкую питательные среды разливают по 10 мл в пробирки, плотную питательную среду разливают в чашки Петри (диаметр 90мм) по 15-20 мл и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

При проведении испытания на присутствие микоплазм возможно 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 Отраслевой стандартный образец тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230 (ОСО) в соответствии с инструкцией по применению.

Среду считают чувствительной и признают годной для использования, если не позднее 7 сут. инкубации, визуально обнаруживают рост стандартного образца тест-штамма M. arginini G 230 при посеве 10-100 КОЕ (разведение 10^{-7} ,10^{-6}.)

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. hyorhinis, M. synoviae, M. pneumoniae, Acholeplasma laidlawii*.

Определение ингибирующего действия испытуемого образца

Для правильной оценки проводимого испытания на присутствие микоплазм однократно определяют наличие ингибирующего действия для каждого испытуемого материала. Определение ингибирующего действия может быть проведено одновременно с определением ростовых свойств питательной среды.

При проведении испытания по схеме 1 в 3–4 пробирки с 10,0 мл полужидкой питательной среды, содержащей 0,3 % агара, вносят 0,5 мл испытуемого образца и 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230 (разведение 10^{-7}, 10^{-6}). Посевы инкубируют в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) °С.

При проведении испытания по схеме 2 в 100,0 мл жидкой питательной среды вносят 10,0мл испытуемого образца и 10 - 100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230, инкубируют в течение 5-7 сут и далее высевают по 0,5–1,0 мл на полужидкую среду, содержащую 0,3 % агара. Посевы инкубируют в течение 7 сут при температуре (37 ± 1) °С.

В качестве положительного контроля, в зависимости от применяемой схемы, вносят 10–100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230.

В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы питательных сред.

Учет результатов проводят визуально в прямом проходящем свете, сравнивая рост тест-штамма *M. arginini* G230 в положительном контроле и в посевах испытуемого материала. Если в посевах испытуемого материала рост микоплазм визуально сравним с ростом в посевах положительного контроля, делают вывод о том, что препарат в условиях испытания не обладает ингибирующим (антимикробным) действием. В этом случае испытание проводят стандартными методами.

Если в посевах положительного контроля наблюдают рост микоплазм, а в посевах испытуемого материала рост отсутствует или значительно слабее, считают, что испытуемый материал обладает ингибирующим (антимикробным) действием, которое следует устранить.

Схема 1. Испытание на присутствие микоплазм методом прямого посева

Обнаружение микоплазм микробиологическим методом состоит из следующих этапов:

1. Испытуемый образец вносят по 0,5 мл в каждую из 10 пробирок с полужидкой питательной средой, содержащей 0,3 % агара (среда Каган полужидкая). Допускается использование свежеприготовленной полужидкой питательной среды с температурой 36-38 °С. Посев производят прокалыванием всего столбика питательной среды концом пипетки, выпуская равномерно ее содержимое при продвижении пипетки в толще среды от дна к ее поверхности.

2. Посевы инкубируют в течение 14 сут при температуре (37 ± 1) °С.

3. 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 инкубированием в жидкой среде

Испытанию подлежат образцы, вызывающие помутнение питательной среды, обладающие ингибирующим действием а также сыворотки крови животных, трипсин и другие вспомогательные материалы.

Методика включает посев испытуемого образца в жидкую питательную среду (среда Каган жидкая) для накопления микоплазм, предварительное инкубирование в течение 5-7 сут с последующим посевом в полужидкую

питательную среду, содержащую 0,3 % агара и инкубирование в течение 14 сут.

Обнаружение микоплазм микробиологическим методом с предварительным инкубированием состоит из следующих этапов:

1.Вносят 10,0 мл испытуемого образца в 100 мл жидкой питательной среды, инкубируют в течение 5-7 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C.

При испытании сыворотки крови животных вносят 100 мл испытуемого образца в 300 мл жидкой питательной среды, смесь инкубируют в течение 5-7 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C. В случае испытания ограниченного количества материала (сыворотки крови приматов, человека и др.) используют меньшее количество испытуемого образца, сохраняя указанное соотношение.

2. Проводят посев на 5-7 сут от начала испытания. Вносят по 0,5–1,0 мл смеси в каждую из 10 пробирок с полужидкой средой, содержащей 0,3 % агара.

3.Инкубируют в течение 14 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C.

4. 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.

5. В качестве отрицательного контроля одновременно инкубируют образцы всех используемых питательных сред.

Учет и интерпретация результатов испытания микробиологического (культурального) метода

Учет результатов испытания по обеим схемам проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в прямом проходящем свете на уровне глаз при достаточной освещенности на 3, 7, 10 и 14 сут, сравнивая посевы с отрицательными контрольными образцами. На 14 сут проводят окончательный учет результатов.

На полужидкой среде наличие роста микоплазм оценивают по обнаружению в зоне посева колоний микоплазм в виде беловатых полупрозрачных округлых образований, зернистости, тонкой паутинки или светлых облачков.

Рост микоплазм на жидкой питательной среде характеризуется незначительным помутнением и опалесценцией питательной среды.

При необходимости, для подтверждения наличия микоплазм используют плотную питательную среду, содержащую 1,3 % агара (среда Каган плотная). Посев производят на чашки Петри по 0,5-1,0 мл из жидкой среды или зоны роста на полужидкой среде и инкубируют в течение не более 7-8 сут при температуре (37 ± 1) ^{o}C. Учет результатов на плотной питательной среде проводят путем исследования засеянных чашек Петри в световом микроскопе при увеличении ок.10×, об.20× или ок.10×, об.40×.

Рост микоплазм на плотной питательной среде характеризуется формированием характерных колонии 0,1-0,3 мм в диаметре, в форме «яичницы-глазуньи», как правило, с плотным приподнятым центром и ажурной периферией или равномерно зернистые.

При отсутствии характерного роста микоплазм на питательных средах считают, что контаминация микоплазмами не обнаружена и испытуемый образец удовлетворяет требованиям испытания.

Обнаружение характерного роста микоплазм на питательных средах свидетельствует о контаминации испытуемого образца микоплазмами и образец считается не соответствующим требованиям испытания.

Испытание считается недействительным, если обнаружен нетипичный, вызывающий сомнения рост микоплазм или 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 обнаружении роста микоплазм в отрицательном контроле. В случае признания испытания недействительным проводят повторные испытания.

Метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод)

Обнаружение в клеточных культурах труднокультивируемых на питательных средах видов микоплазм может проводиться цитохимическим экспресс-методом, основанным на способности флюорохромов связываться и окрашивать ДНК микоплазм и клеток. Получение клеточного монослоя на стекле, фиксирование, окрашивание клеток специфическим флюоресцирующим красителем Hoechst-33258 (Bisbenzimide), DAPI или аналогичным и микроскопирование в люминесцентном микроскопе позволяют получать результаты исследования немедленно или на 3-5 сутки испытания.

Метод обнаружения микоплазм с использованием индикаторной клеточной культуры (клеточная культура Vero) основан на внесении испытуемого образца в клеточную культуру, получение клеточного монослоя на стекле, фиксирование, окрашивание специфическим флюоресцирующим красителем ДНК и микроскопирование в люминесцентном микроскопе. В качестве индикаторной может быть использована производственная клеточная культура или другая клеточная культура чувствительная к микоплазмам. Выбранная индикаторная клеточная культура считается подходящей, если позволяет обнаруживать 10-100 КОЕ микроорганизмов тест-штамма M. arginini G230 или M. orale, M. hyorhinis, A. laidlawii. Культивирование индикаторной клеточной культуры проводится без использования антибиотиков.

Испытание клеточных культур адаптированных к суспензионному культивированию, вирусных штаммов, вирусных сборов, и других вирусных суспензий на присутствие микоплазм проводят с использованием индикаторной клеточной культуры, как правило, после нейтрализации вируса специфической иммунной сывороткой, не обладающей ингибирующим действием в отношении микоплазм. Также может быть использована клеточная культура не чувствительная к размножению вируса.

Методика испытания методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим методом)

Испытание на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры проводят в асептических условиях, выполняя следующие операции.

1. В стерильную чашку Петри (диаметр 90 мм) помещают предварительно подготовленное предметное стекло и вносят 20–23 мл суспензии клеточной культуры Vero в питательной среде Игла МЕМ или ДМЕМ в концентрации не более 10^5 кл/мл и добавляют не более 5 % сыворотки крови плодов коровы, предварительно прошедшей контроль на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами.

2. Вносят 1,0 мл испытуемого образца в чашку Петри с клеточной суспензией культуры Vero и инкубируют в течение 3–5 сут при температуре (36 ± 1) ^{o}C в атмосфере с (5,0±0,5) % CO_2 до формирования 50-70 % монослоя. Образование монослоя наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок.10×, об.20×.

3. По достижении 50-70 % клеточного монослоя культуральную жидкость сливают, осторожно промывают стекло фосфатным буферным раствором (pH 7,2-7,4), используя не менее 100мл.

4. Помещают предметное стекло на 30–35 мин в 96^{o} этиловый спирт.

5. Спирт сливают и сушат предметное стекло с клеточным монослоем на воздухе.

6. Окрашивают предметное стекло с клеточным монослоем рабочим раствором красителя Hoechst-33258 в защищенном от света месте при температуре (36 ± 1) ^{o}C в течение 30–35 мин.

7. Краситель сливают, предметное стекло с монослоем промывают стерильной водой очищенной, используя не менее 100мл, подсушивают на воздухе и просматривают в люминесцентном микроскопе.

Учет и интерпретация результатов испытания методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим методом)

Учет результатов испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим методом) проводят путем исследования приготовленных на стекле препаратов в люминесцентном микроскопе. Микоплазмы преимущественно выявляются по границам клеток и в межклеточном пространстве в виде мелкой ярко светящейся зернистости на фоне темной, не имеющей свечения цитоплазмы. Микроскопически микоплазмы выглядят как однородно окрашенные тела сферической формы диаметром 0,1-0,3 мкм, в виде парных, цепочечных, нитевидных образований с яркой зеленоватой флюоресценцией.

При учете результатов положительными контрольными образцами могут служить готовые контрольные препараты или контаминированные микоплазмами культуры клеток, а отрицательными - клеточные культуры, в которых микоплазмы не выявлены или готовые контрольные препараты. Сравнительные исследования микроскопической картины испытуемого образца с микроскопическими картинами положительного и отрицательного контроля позволяют идентифицировать флюоресценцию микоплазм - контаминантов испытуемого материала.

При отсутствии характерной для микоплазм флюоресценции считают, что контаминация микоплазмами не обнаружена и испытуемый образец удовлетворяет требованиям испытания.

Обнаружение характерной для микоплазм флюоресценции свидетельствует о контаминации испытуемого образца микоплазмами и образец считается не соответствующим требованиям испытания.

Результаты испытания будут считаться недостоверными, если в образцах положительного контроля микоплазмы не обнаружены, а обнаружены в отрицательном контроле. В случае получения сомнительных результатов следует проводить повторные испытания.

Примечания

1. Приготовление красителя Hoechst-33258 (Bisbenzimide)

А. Приготовление концентрированного раствора. В 100 мл стерильной воды очищенной растворяют 5,0 мг красителя. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С 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 немедленно используют для окраски испытуемых образцов. Рабочий раствор хранению не подлежит.

2. Подготовка люминесцентного микроскопа.

Проводят подготовку люминесцентного микроскопа к работе согласно Руководству по эксплуатации. 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 10–15мин, 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.

Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания **ОФС.1.7.2.0032.15**

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 ± 1) °С 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 ± 1) ºС 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 ±1) ºС 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 ± 1) ^{0}С 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 ± 1) ºС 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 ± 1) ºС 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**

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 биологических лекарственных препаратов (БЛП).

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, меченными 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 иммобилизированным 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.

Неконкуретный 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 (pH 9,6), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и далее проводят сорбцию при температуре 4 ^{o} С в течение 16 ч. Возможно использование других буферных растворов с высокими значениями pH. Инкубация проводится при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка (двукратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется фосфатно-солевым буферным раствором (pH 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 (pH 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 козьи 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 (pH 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 (pH 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 (pH 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 (pH 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 pH до 9,6, перемешивают, далее доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.

Определение подлинности аллергенов **ОФС.1.7.2.0034.15**

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 ± 1) °С, а затем на 16–18 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С.

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 °С в течение 5 дней или при температуре минус 40 °С 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 – мышиные моноклональные антитела к IgE человека, меченные пероксидазой, концентрированные.

9. Разводящий и промывающий раствор – фосфатно-солевой буферный раствор с твином 20 концентрированный (pH 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 ± 1) ^{0}C.

3. Холодильник (8 ± 1) ^{0}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 (pH 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 ± 1) ^{0}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 (pH 7,2–7,4)	При температуре (8 ± 1) ^{0}C в течение суток
Раствор конъюгата (№2)	0,1 мл мышиных моноклональных антител к IgE человека концентрированных, меченных пероксидазой, довести до необходимой концентрации рабочим раствором № 1	Готовить непосредственно перед применением
Растворы референс-сыворотки		
• Раствор А (без разведения)	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±1) °С.

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 A, B – раствор A; в лунки C, D – раствор B; в лунки E, F – раствор C; в лунки G, H – раствор D.

3. В оставшиеся ряды вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контролей: в лунки A–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±1) °С 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 ± 1) °С 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 ± 2) °С.

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 в течение 10 мин после остановки реакции. Вычисляют средние арифметические показателей 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

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
A	КК	A	AC	AC								
B	КК	A	AC	AC								
C	КК	B	AC	AC								
D	КК	B	AC	AC								
E	КК	C	AC	AC								
F	КК	C	AC	AC								
G	КК	D	OC	OC								
H	КК	D	OC	OC								
	Референс-аллерген	Референс-аллерген	Аллерген полыни	Аллергоид полыни								

Примечание: 1,2,3,4 – ряды лунок планшета;
КК – контроль конъюгата - «холостая» проба;
A, B, C, D – растворы референс-сыворотки;
AC – аллерген-специфическая сыворотка (положительный контроль);
OC – отрицательная сыворотка (отрицательный контроль);

Планшет закрывают крышкой и инкубируют 16–18 ч при температуре (8 ± 1) °С 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,

B – раствор A; в лунки C, D – раствор B; в лунки E, F – раствор C; в лунки G, H – раствор D.

В ряды 3 и 4 вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контроля: в лунки A–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 ± 1) °С 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 ± 1) °С 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 ± 2) °С.

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 специфическихIgE - 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).

Пептидное картирование **ОФС.1.7.2.0035.18**

Вводится впервые

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Пептидное картирование (или составление пептидных карт) является методом идентификации белков, в особенности получаемых методом рекомбинантных ДНК.

Метод включает в себя этапы химического или энзиматического расщепления белков до образования пептидных фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов в воспроизводимых условиях.

Это надежный метод испытания, характеризующийся достаточной специфичностью и позволяющий произвести идентификацию замены практически каждой отдельной аминокислоты, произошедшего в результате таких явлений, как ошибка в считывании последовательности комплементарной ДНК (кДНК), либо являющегося результатом мутации.

Составление пептидных карт является сравнительным испытанием, поскольку получаемая информация сравнивается со стандартным образцом, подвергающимся аналогичному воздействию. Данное испытание позволяет подтвердить первичную структуру белка, определить возможные изменения первичной структуры в случае наличия таковых, подтвердить соответствие технологического процесса и генетическую стабильность.

Статья содержит описание аспектов использования и валидации метода пептидного картирования с целью получения характеристики

анализируемого белка, оценки стабильности клеточных систем экспрессии, используемых для получения продуктов рекомбинантных ДНК и оценки согласованности процесса в целом — в отношении как оценки стабильности продукта, так и обеспечения идентичности белка, либо определения содержания протеинов с изменениями в структуре.

Составление пептидных карт может рассматриваться как метод получения «отпечатков пальцев» белка и представляет собой получаемую в результате ряда химических процессов полную расшифровку анализируемого белка. Метод включает четыре принципиальные стадии: выделение и очистка белка (или «подготовка белка к гидролизу») — в случае, если белок входит в состав какой-либо смеси; избирательное расщепление пептидных связей (гидролиз); хроматографическое разделение образующихся пептидных фрагментов; анализ и идентификация пептидов.

Анализируемый образец подвергается расщеплению и анализу параллельно со стандартным образцом. Полное расщепление пептидных связей более вероятно при использовании ферментов, таких как эндопептидазы (например, трипсин), а не химических гидролизующих реагентов. Для того, чтобы карта была информативной, она должна содержать достаточное количество пептидов. С другой стороны, в случае, если пептидных фрагментов будет слишком много, карта может утратить свою специфичность, поскольку у многих белков может оказаться аналогичный профиль.

Пептидное картирование не является общим методом, а заключается в составлении индивидуальных карт для каждого отдельного белка.

Методики испытания должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанции или лекарственную форму.

ПОДГОТОВКА БЕЛКА К ГИДРОЛИЗУ

Подготовка белка к гидролизу включает этапы подготовки белка к расщеплению (восстановление, денатурацию, алкилирование и пр.) выделение и очистку белка от вспомогательных соединений.

Подготовка белка к гидролизу, в т.ч. этап выделения и очистки являются обязательными при проведении испытания нерасфасованных или дозированных форм лекарственных средств, содержащих белки, в тех случаях, когда они содержат мешающие испытанию вспомогательные вещества или белковые носители.

Количественное извлечение белка из дозированной формы должно быть валидировано.

В зависимости от размера, конфигурации белка, а также состава лекарственного средства и готовой лекарственной формы, используются различные подходы в подготовке белка к гидролизу.

В некоторых случаях может быть необходимо концентрирование образца либо отделение белка от используемых в готовой лекарственной форме сопутствующих веществ и стабилизаторов, которые могут искажать результаты картирования.

Для обеспечения полного доступа фермента к местам разрыва связей во многих случаях необходимо сократить число дисульфидных связей путем их восстановления и алкилирования, а так же использовать частичную денатурацию белка добавлением соответствующих агентов. В качестве восстанавливающих агентов возможно использование, например, дитиотрейтола или меркаптоэтанола, для алкилирования йодацетамида, 4-винилпиридина, йодуксусной кислоты, для денатурирования мочевины, и гуанидина.

Физические методы выделения и очистки белка с использованием колоночной хроматографии, диализа, ультрафильтрации, лиофилизации могут использоваться в ходе подготовки белка к гидролизу наряду с восстановлением, алкилированием и денатурацией или как самостоятельные процедуры.

Очистка белка от низкомолекулярных компонентов, входящих в состав лекарственного средства или лекарственного препарата может проводиться различными методами. Наиболее часто используются следующие способы,

отличающиеся техническим исполнением позволяющих отсекать вещества с различной молекулярной массой: гельфильтрация (обессоливание), например с использованием таких сорбентов как сефадекс, диффузия низкомолекулярных соединений через полупроницаемую мембрану (диализ) и ультрафильтрация с использованием фильтров, снабжённых мембранами с различным размером пор из восстановленной целлюлозы, полиэфирсульфона, ацетата целлюлозы, нейлона.

Наиболее типичными реагентами, входящими в состав буферных растворов, используемых в ходе пробоподготовки являются ACES-буферный раствор, три(гидроксиметил)-аминометан, гидроксиламин, этилдиаминотетрауксусная кислота и др.

Подготовка белка с использованием перечисленных методов проводится до этапа расщепления пептидных связей и пептидного картирования.

Подробное описание процедур выделения и очистки белка приводится в нормативной документации.

Избирательное расщепление пептидных связей

Выбор метода расщепления пептидных связей зависит от анализируемого белка. Процедура выбора включает определение требующегося типа расщепления (химического или ферментативного), а также типа протеолитического реагента в рамках выбранной категории. В таблице 1 приводится ряд протеолитических реагентов и их специфичность в отношении пептидных связей. Помимо указанных, могут быть использованы другие реагенты, способные расщеплять пептидные связи.

Таблица 1. *Примеры реагентов для расщепления пептидных связей*

Тип	Реагент	Специфичность
Ферментативные	Трипсин	*C*-концевые аргинин и лизин
	Химотрипсин	*C*-концевые гидрофильные остатки (например, лейцин, метионин, аланин, ароматические аминокислоты)
	Пепсин	Неспецифический реагент
	Лизилэндопептидаза (Lys-C эндопептидаза)	*C*-концевой лизин
	Глутамилэндопептидаза (из S.aureus штамм V8) (ГФ 13…)	*C*-концевые глутамин и аспарагин
	Эндопептидаза B Пептидил-Asp металло-эндопептидаза (эндопротеаза Asp-N)	*N*-концевой аспарагин
	Клострипаин (*ГФ 13…*)	*C*-концевой аргинин
Химические	Цианобромид	*C*-концевой метионин
	2-Нитро-5-тио-цианобензойная кислота	*N*-концевой цистеин
	О-Йодозобензойная кислота	*C*-концевые триптофан и тирозин
	Разбавленная кислота	Аспарагин и пролин
	BNPS-скатол	Триптофан

Расщепление пептидных связей с использованием трипсина может привести к отклонениям от пептидной карты, полученной в ходе валидации методики, в следствие протекающих параллельно с протеолитическим расщеплением побочных реакций, таких как неспецифическое расщепление, дезаминирование, дисульфидная изомеризация, окисление остатков метионина, образование пироглутаминовых групп при дезаминировании глутамина и *N*-концевых участков пептида.

Изменения в пептидной карте в виде дополнительных пиков могут также появляться в следствие автогидролиза трипсина. Интенсивность их

образования зависит от соотношения содержания трипсина к белку в реакционной смеси. Для предотвращения автогидролиза растворы протеаз готовят при pH, отличном от оптимального (например, при pH 5 для трипсина), благодаря чему фермент не переходит в активное состояние до момента разведения с буферным раствором.

В некоторых случаях, при использовании трипсина для расщепления пептидных связей белка с молекулярной массой более 100 000 Да, может потребоваться защита лизиновых остатков путем получения производных с лимонной или малеиновой кислотой, так как в противном случае может образоваться слишком большое число пептидных фрагментов.

Требования к реагентам для расщепления пептидных связей.

Под реагентами в процедурах пептидного картирования подразумеваются химические агенты и ферменты, используемые для расщепления пептидных связей.

Требования к квалификации и качеству реагентов должны быть указаны в нормативной документации.

Использование реагентов, особенно ферментов, квалификации и качества отличных от установленной в ходе валидации методики, например другого производителя, нежели указано в нормативной документации, может привести к невоспроизводимости хроматографических профилей.

В случаях, когда требуется какая-либо специальная подготовка реагента, например, для обеспечения определённой чистоты фермента или химического агента, эти процедуры должны быть описаны в нормативной документации

Установление оптимальных условий для расщепления пептидных связей.

Факторы, которые влияют на полноту и эффективность расщепления протеинов, являются факторами, оказывающими влияние на химические и ферментативные реакции.

pH реакционной среды. Значение pH смеси, в которой осуществляется расщепление пептида, определяется эмпирически и направлено на оптимизацию состояния расщепляющего реагента. Например, при использовании при использовании трипсина в качестве расщепляющего агента оптимальной является слабощелочная среда (pH 8), применение цианобромида в качестве расщепляющего реагента требует создания сильнокислой среды (например, pH 2, за счёт использования муравьиной кислоты). Главным является требование, что бы значение pH реакционной среды не изменяло структуру белка в ходе реакции расщепления и не изменялось в ходе проведения гидролиза.

Температура. Для большинства реакций расщепления наиболее подходящей является температура в интервале от 25 °C до 37 °C.

Создаваемая температура должна способствовать минимизации побочных химических реакций. Тип протеина, подвергаемого расщеплению, определяет выбор температуры реакционной среды, поскольку некоторые белки с повышением температуры склонны к денатурации. Например, расщепление рекомбинантного бычьего соматропина проводится при температуре 4 °C, поскольку при более высокой температуре он осаждается в ходе проведения реакции расщепления.

Время. Время проведения гидролиза оказывает существенное влияние на получаемую пептидную карту, поэтому следует установить оптимальное время для получения воспроизводимой карты, с одной стороны, и достаточное для проведения полного расщепления, с другой. Время расщепления варьируется от 2 ч до 30 ч.

Реакция гидролиза прекращается либо прибавлением кислоты или других веществ, которые не оказывают влияния на получаемую пептидную карту либо замораживанием. Наиболее часто используются растворы трифторуксусной кислоты, меркаптоэтанол.

Количество используемого расщепляющего реагента. Для обеспечения достаточного быстрого расщепления (от 6 ч до 20 ч) используется

избыточное количество расщепляющего реагента, вместе с тем, его количество должно быть минимизировано, чтобы предотвратить вклад реагента в структуру пептидной карты.

В большинстве случаев протеин, подвергаемый гидролизу, и реагент берут в соотношении от 10:1 до 500:1.

Для оптимизации процедуры расщепления может потребоваться добавление расщепляющего агента в два или более этапов.

При этом степень разведения реагирующей смеси должна оставаться достаточно небольшой для обеспечения следующего этапа пептидного картирования — разделения. Для того, чтобы исключить наличие артефактов, т.е. пиков не относящиеся к белку и их влияние на результаты пептидного картирования, при процедуре расщепления пептидных связей необходимо предусмотреть проведение контрольного определения со всеми реагентами за исключением анализируемого белка.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Для разделения пептидных фрагментов используются различные методы. Выбор метода зависит от белка, для которого составляется пептидная карта.

Методы, наиболее часто используемые для разделения пептидных фрагментов:

1) Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
2) Ионообменная хроматография;
3) Хроматография гидрофобного взаимодействия;
4) Капиллярный электрофорез.

Наиболее часто используемым методом является метод обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка. Для каждого белка выбор колонки осуществляется эмпирически.

Наиболее часто хроматографическое разделение пептидных фрагментов, полученных в результате гидролиза осуществляется на колонках, заполненных сорбентами на основе гидрофобных силикагелей с привитыми группами С18, С8, С4 или иными сорбентами, с размером частиц от 3 нм до 10 мкм или 1,7-2,5 мкм (при использовании ультраэффективной жидкостной хроматографии) и размером пор от 130 до 300 А.

Подвижная фаза. Подвижную фазу выбирают исходя из свойств испытуемого образца, типа сорбента колонки и метода детектирования. Наиболее часто в качестве подвижной фазы используются вода и ацетонитрил в качестве органического модификатора с добавлением 0,1 % кислоты трифторуксусной. При необходимости, для повышения растворимости компонентов смеси, могут прибавлятся 1-пропанол, 2-пропанол или другие модификаторы. Прибавление спиртов не должно приводить к чрезмерному повышению вязкости компонентов.

Подвижная фаза, содержащая фосфатный буфер, может быть использована в случаях, когда необходимо увеличить разделяющую способность системы, поскольку изменение pH в интервале от 3,0 до 5,0 улучшает разделение пептидов, содержащих кислотные остатки (например, глутаминовая и аспарагиновая кислоты). Натрия или калия фосфаты, ацетат аммония, фосфорная кислота при значении pH между 2 и 7 (или выше при использовании полимерного наполнителя) используются с ацетонитрильным градиентом.

Растворители.

В качестве растворителей используются различные буферные растворы.

Способ элюирования.

В большинстве случаев применяется градиентное элюирование, поскольку позволяет достичь эффективного и быстрого разделения пептидных фрагментов, представляющих собой сложные смеси различного состава обладающих различными свойствами

При элюировании рекомендуется низкая скорость изменения состава. Градиент оптимизируют, добиваясь четкого разделения между всеми реперными пиками, выбранными в качестве «маркерных» пиков для проводимого испытания.

Детектирование

Наиболее распространенным детектором при пептидном картировании является спектрофотометрический детектор, с определением поглощения при аналитической длине волны в интервале от 200 нм до 280 нм (обычно 214 (215) нм, могут использоваться так же длины волн 210, 256 нм). Для повышения информативности, используются также флуориметрический и масс-спектрометрический детекторы.

Другие параметры.

Для достижения хорошей воспроизводимости, как правило, требуется контроль температуры колонки, которая варьируется в широких пределах от 25 до 60 ^{0}C. Скорость подвижной фазы составляет от 0,1 мл/мин до 2,0 мл/мин.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Целью валидированного метода характеристики протеина методом пептидного картирования является определение как минимум 95 % теоретического состава структуры белка.

Использование стандартного образца параллельно с испытуемым пептидом является необходимым условием при разработке и валидации методик пептидного картирования.

Разработка методики.

В ходе разработки методики пептидного картирования осуществляется подбор условий подготовки белка к гидролизу и описываются последовательности аминокислот для каждого пептидного фрагмента, получаемого в результате гидролиза.

Установление первичной структуры пептидных фрагментов (последовательности аминокислот), образованных в ходе гидролиза

необходимо, поскольку пептидное картирование обеспечивает как подтверждение известной первичной структуры, так и идентификацию структуры отличающихся по составу белков (в случае их наличия) при сравнении с пептидной картой стандартного образца пептида, структура которого установлена.

Разработка и валидация метода составления пептидных карт при разработке нормативной документации на лекарственное средство требует исчерпывающей характеристики каждого из индивидуальных пиков пептидной карты. Для характеристики индивидуальных пиков могут быть использованы как метод *N*-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, так и метод с использованием масс-спектроскопии.

В случаях, когда для установления первичной последовательности аминокислот используется метод *N*-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, аналитическое разделение масштабируют для целей препаративного разделения. Необходимо убедиться на основании эмпирических данных, что ухудшения разрешения между пиками вследствие проведения масштабирования не происходит. Элюаты, соответствующие пикам определённых пептидных фрагментов, собирают, концентрируют и повторно хроматографируют, при необходимости. Аминокислотный анализ фрагментов может быть ограничен размером пептидов. В случае если *N*-концевая аминокислота заблокирована, может потребоваться ее высвобождение до секвенирования. С целью получения характеристики может также использоваться *C*-концевое секвенирование белков в комбинации с карбоксипептидазой и методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным масс-анализатором (*MALDI-TOF*).

Использование масс-спектроскопии для характеристики пептидных фрагментов производится либо путем непосредственного введения выделенных пептидов, либо с использованием *on-line* системы ВЭЖХ с масс-спектрометром для анализа разделяемых фрагментов.

Тандемная масс-спектроскопия также используется для определения последовательности модифицированных белков и для определения типа произошедшей аминокислотной модификации.

Идентификация полученных фрагментов может быть осуществлена с помощью современных компьютерных баз данных.

Определение расположения дисульфидных связей в различных сульфгидрил-содержащих пептидах может быть произведено методом сравнения масс-спектров продукта расщепления до и после восстановления.

Если некоторые части первичной структуры не могут быть достаточно четко отражены пептидной картой, может потребоваться составление вторичной пептидной карты. Получение вторичной пептидной карты заключается в выделении полученных при гидролизе пептидных фрагментов с последующим их вторым расщеплением в выбранных условиях, хроматографическим разделением, обнаружением и идентификацией. Выделение пептидных фрагментов после первого гидролиза проводится, как правило, методами колоночной хроматографии. Условия гидролиза, разделения и идентификации при получении вторичной пептидной карты отличаются от условий получения первичной пептидной карты.

Для каждого из белков характерна совокупность уникальных свойств, обусловленных его первичной структурой и структурами более высокого порядка. Пики пептидных фрагментов наиболее характерных для данного пептида и/или отражающих наиболее важные свойства испытуемого пептида, например, комплимент зависимую область, выбираются в качестве характерных (реперных) пиков. Выбор реперных пиков должен быть обоснован, а перечень реперных пиков приводится в нормативной документации.

Валидация.

Методики пептидного картирования подлежат валидации. Характеристики, подлежащие валидации определяются критическими параметрами испытания, влияющими на интерпретацию результатов и их

приемлемость. К критическим параметрам методик пептидного картирования относятся специфичность, прецизионность, устойчивость, а также полнота проведённого гидролиза.

Использование стандартного образца параллельно с испытуемым белком является необходимым при установлении значений критериев валидации методики и разработке на их основе критериев оценки пригодности системы.

Для контроля полноты требуемого расщепления пептидных связей (степени гидролиза) используется сравнение со стандартным образцом, который подвергается такому же воздействию, как и испытуемый пептид.

Степень гидролиза может подтверждаться сопоставлением теоретической и фактической пептидных карт, оценкой степени инверсии белка, воспроизводимостью пептидной карты в части количества и интенсивности (относительной интенсивности) пиков и другими способами.

Сопоставление теоретической и фактически полученных пептидных карт осуществляется в ходе разработки и валидации методики. Теоретическая и фактически полученная пептидные карты должны соответствовать друг другу. Теоретическая пептидная карта составляется на основании первичной структуры пептида и специфичности используемого реагента в части сайтов расщепления.

Полного соответствия фактической пептидной карты теоретической возможно достичь не всегда.

На фактической пептидной карте, например, возможно присутствие сдвоенных пиков пептидных фрагментов, т.е. пиков, получаемых элюированием двух пептидных фрагментов. Наличие отдельных сдвоенных (неразделенных) пиков на пептидной карте допускается, если это не снижает надёжности подтверждения первичной структуры пептида. Сдвоенные пики не должны включать пептидные фрагменты с участками пептида, обеспечивающими фармакологическое действие или активность

лекарственного средства, т.е. критичные для свойств анализируемого пептида.

Наличие сдвоенных пиков должно быть подтверждено и обосновано при разработке и валидации методики испытания и указано в нормативной документации на лекарственное средство.

На фактической пептидной карте возможно отсутствие отдельных пиков коротких пептидных фрагментов, обладающих низкой интенсивностью. Отсутствие отдельных пиков коротких пептидных фрагментов, обладающих низкой интенсивностью на пептидной карте, допускается, если это не снижает надёжности подтверждения первичной структуры пептида. На пептидной карте не должны отсутствовать пики, пептидных фрагментов, содержащих участки пептида, обеспечивающих фармакологическое действие или активность лекарственного средства, т.е. критичные для свойств анализируемого пептида. Возможность отсутствия отдельных пиков должна быть подтверждена и обоснована при разработке и валидации методики испытания и указана в нормативной документации на лекарственное средство.

Степень инверсии белка оценивается наличием интактного белка и его количеством, выражаемым интенсивностью пика интактного белка.

Установление параметров пригодности системы.

Критические параметры оценки пригодности системы для пептидного картирования будут зависеть от конкретного используемого метода разделения и детектирования, а также требований к получаемым в результате испытания данным.

Подтверждение специфичности.

При валидации специфичности методики проводится сопоставление теоретической и фактической пептидных карт изучаемого пептида, а так же подтверждение наличия выраженных отличий в пептидных картах изучаемого пептида и пептидов, отличающихся от него по составу путём сопоставления пептидных карт каждого из анализируемых пептидов.

Для подтверждения наличия выраженных отличий в пептидных картах может быть использована охарактеризованная по составу смесь, включающая стандартный образец изучаемого пептида и пептид, отличный от него по структуре. Использование охарактеризованных по составу смесей наиболее показательны в случае, если пики (реперные пики) отличных по составу пептидов элюируются в области худшего разделения пиков на пептидной карте

В качестве пептида, отличного по структуре от испытуемого образца может быть использован пептид принципиально иной структуры, например, производимый на одной производственной площадке и сходный по молекулярной массе с испытуемым пептидом или вариант испытуемого пептида, отличный от него в определённых участках первичной последовательности (вариабельный пептид) или пептид близкой структуры, но имеющий выраженные отличия в небелковой части молекулы (например, пегилированный и непегилированный варианты пептида).

Специфичность методики так же дополнительно оценивается статистической обработкой соотношений анализируемых параметров пиков и хроматографического профиля смеси 1:1 (об/об) продуктов гидролиза испытуемого образца и стандартного образца.

Специфичность методики и идентичность анализируемого образца пептида подтверждается, если все пики продуктов гидролиза изучаемого пептида и его стандартного образца имеют аналогичные времена удерживания и соотношения оцениваемых параметров пиков. Если пики, которые изначально характеризовались значительно различающимися временами удерживания, затем в смеси 1:1 обнаруживались единым пиком, изначально выявленное различие является показателем нестабильности выбранной системы разделения пептидов. Однако если в смеси 1:1 наблюдаются разделенные пики, это является доказательством наличия различных пептидов в каждом из пиков. Если пик в смеси 1:1 существенно

шире, чем соответствующий пик в анализируемом белке и стандартном образце, это может означать наличие различных пептидов.

Разделительная способность системы

При определении структуры пептида методом пептидного картирования важнейшим критерием пригодности системы является её разделительная способность.

В зависимости от изучаемого пептида и используемого метода разделения могут устанавливаться требования к разрешению между пиками двух или более пептидных фрагментов. Наиболее критичным параметром будет разрешение между пиками пептидных фрагментов, выбранных в качестве реперных или между пиками, один из которых является реперным.

Прецизионность

Прецизионность является одной из основных характеристик, оцениваемых в ходе валидации методики пептидного картирования.

Валидируется воспроизводимость таких характеристик пептидной карты как количество реперных пиков, интенсивность или относительная интенсивность реперных пиков (высота или площадь), разрешение между пиками.

Требования к специфичности, разделительной способности и прецизионности должны быть включены в оценку пригодности системы в нормативной документации на лекарственное средство.

При оценке специфичности, разделительной способности и прецизионности методики требуется получение фактических пептидных карт как стандартного так и испытуемого образцов изучаемого пептида.

Валидации могут подлежать другие характеристики методики, рассматриваемые в качестве её критичных параметров, например, визуальный контроль растворимости пептида, чувствительность системы, т.е. измерение откликов трудно расщепляемых пептидов, степень присутствия интактного пептида, оценка мешающего влияния плацебо, возможность автогидролиза трипсина.

Например, валидация и включение в методику нормативной документации оценки чувствительности системы необходимы в том случае, если пики, содержащие пептидные фрагменты критичные для свойств анализируемого пептида, обладают низкой интенсивностью.

Представляемые данные по валидации методики должны включать типичные хроматограммы стандартного и испытуемого образцов.

Обнаружение и идентификация пиков пептидных фрагментов выполняются при помощи внутренних и внешних стандартов. В качестве внешних стандартов используется стандартный образец идентифицируемого пептида. В качестве внутреннего стандарта используется один из пиков пептидной карты, демонстрирующий наименьшую вариабельность в качестве в части своего времени удерживания и интенсивности (высоты или площади).

Способ обнаружения и идентификации пиков пептидных фрагментов приводится в нормативной документации на лекарственное средство.

Небольшие отличия в числе обнаруженных пиков пептидных фрагментов, степени их разрешения, интенсивности, а так же других характеристиках прецизионности, по сравнению с валидированными значениями, является ожидаемым явлением при воспроизведении методик пептидного картирования. Поэтому особенно важно включение чётких критериев соответствия, а также пределов допустимого отклонения для указанных параметров пригодности системы, в нормативную документацию на лекарственное средство.

Оценка результатов и идентификация пептидов

Идентификация пептидов включает в себя визуальную оценку полученных пептидных карт испытуемого и стандартных образцов, а также количественную оценку.

Оценке могут подлежать как полная пептидная карта, так и выбранные характерные участки хроматограмм испытуемого и стандартного образцов. Выбор участков должен быть обоснован в ходе валидации.

Визуальной оценке, в сравнении со стандартным образцом, подлежат: общая картина элюирования, выражаемая общим числом пиков, их относительной интенсивностью, наличием реперных пиков.

Количественной оценке подлежат: времена удерживания или относительные времена удерживания пиков (обычно реперных), параметры интенсивности пиков (площадь или высота) или их относительные значения. Количественная оценка может проводиться как по сравнению с внешним, так и по сравнению с внутренним стандартом.

Использование внутреннего стандарта при оценке интенсивности пиков позволяет исключить влияние возможного не полного гидролиза пептида, воспроизводимости этапов пробоподготовки (выделения и очистки белка). Выбор внутреннего стандарта должен быть обоснован в ходе валидации.

Как альтернативный вариант для испытуемого образца может быть рассчитан процент площади или высоты пика каждого пептидного фрагмента относительно суммы площади или высоты всех пиков или относительно одного пика, выбранного в качестве реперного. Затем полученный процент сравнивается со значением аналогичного параметра соответствующего пика стандартного образца.

Возможность автогидролиза трипсина контролируется при помощи создания пептидной карты плацебо, получаемой при обработке трипсином раствора без определяемого пептида.

Идентификация пептида и соблюдение специфичности методики, кроме сравнения с пептидной картой стандартного образца, подтверждаются и дополняются анализом хроматографического профиля и параметров пиков смеси 1:1 (об/об) продуктов гидролиза испытуемого образца и стандартного образца.

Можно произвести множественное сравнение времен удерживания и площадей или высоты пиков для выбранной группы соответствующих пиков, которые однозначно идентифицируются на пептидной карте.

Учитывая возможную вариабельность пептидных карт нормативный документ дополняют рисунками типичных пептидных карт стандартного и испытуемого образцов с указанием пиков (групп пиков) характерных пептидных фрагментов (реперных пиков).

Возможность присутствия на пептидной карте испытуемого образца пиков, не сопоставимых с пептидной картой стандартного образца (кроме областей выхода реперных пиков), их количество, время выхода и интенсивность (относительная интенсивность) должна быть указана в нормативной документации на лекарственное средство и обоснована.

Проведение как минимум двух параллельных испытаний продуктов гидролиза стандартного образца снижает вероятности проявления вариабельности пептидных карт при воспроизведении методик и позволяет подтвердить критерии прецизионности, и более точно оценить прочие количественные характеристики системы, если они включены в оценку пригодности системы.

Количество параллельных испытаний анализируемого и стандартного образцов указываются в нормативной документации на лекарственное средство.

Критерии пригодности системы разделения пептидных фрагментов

Пригодность системы разделения пептидных фрагментов является минимальным требованием для оценки качества пептидного картирования, которая включает в качестве контроля в нормативную документацию на лекарственное средство.

Нормы к каждому из критериев пригодности системы разделении рассмотренных ниже, а так же иные критерии, специфичные для каждого идентифицируемого пептида, необходимые для подтверждения соблюдения валидированного уровня специфичности, воспроизводимости и чувствительности системы должны быть установлены в ходе валидации.

В оценку пригодности в нормативной документации на лекарственное средство включают:

соответствие фактически полученной пептидной карты гидролизата стандартного образца пептидной карте, прилагаемой к указанному стандартному образцу в части общей картины элюирования, выражаемая общим числом пиков, их относительной интенсивностью, наличием всех характерных (реперных) пиков;

соответствие фактической разделительной способности системы установленным валидированным требованиям. Оценка разделительной способности проводится путём оценки разрешения или соотношения пик/долина между пиками наиболее важных пептидных фрагментов.

прецизионность времени удерживания или относительного времени удерживания пиков пептидных фрагментов или реперных пиков;

прецизионность интенсивности или относительной интенсивности реперных пиков (высоты или площади). Прецизионность оценивается величиной относительного стандартного отклонения

отсутствие на пептидной карте плацебо пиков в интервале времени выхода пиков пептидных фрагментов идентифицируемого пептида;

Наряду с перечисленными критериями, могут оцениваться и другие параметры, (например, ширина пиков у основания, асимметрия) в случае, если контроль этих параметров необходим для подтверждения специфичности и прецизионности получаемых результатов.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов	**ОФС.1.7.2.0036.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для идентификации пептидов.

Подтверждение подлинности пептидов методом ЯМР проводят в соответствии с ОФС 1.2.1.1.0007.15.

Общие принципы. Установление подлинности пептида осуществляют путем сравнения одномерных спектров испытуемого образца (как правило, ^{1}H и ^{13}C) со спектрами стандартного образца или с опубликованными стандартными спектрами. При отсутствии стандартного образца можно использовать рабочий стандартный образец, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией одномерных спектров (применимо к олигопептидам до 20 аминокислотных остатков при естественном содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N). Структурная интерпретация осуществляется с использованием двумерных методов корреляционной спектроскопии (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC). В основе данных методов лежит общий подход переноса намагниченности от одного спина ядра к другому посредством спин-спинового взаимодействия, химического обмена или кросс-релаксации.

Гомоядерная корреляционная спектроскопия (COSY) в различных модификациях используется для идентификации ядер (чаще всего ^{1}H), разделенных двумя или тремя химическими связями и участвующих в спин-спиновом взаимодействии друг с другом. Полная корреляционная

спектроскопия (TOCSY) позволяет регистрировать наличие спин-спинового взаимодействия между однотипными ядрами, которые связаны между собой непрерывной цепочкой взаимодействий. Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия HSQC определяет корреляции между атомными ядрами двух разных типов, которые разделены одной связью (как правило, между протонами и ядрами углерода в определенном углеводородном фрагменте). Гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия HMBC определяет корреляции между протонами и ядрами X (как правило, ^{13}C), разделенными двумя или тремя связями (в редких случаях большим числом связей).

Прибор. Если не предписано иное, используют импульсный ЯМР спектрометр с рабочей частотой не менее 300 МГц.

Методика. При необходимости испытуемый образец подвергают предварительной лиофилизации. Испытуемый образец или его лиофилизат растворяют в дейтерированном растворителе, к которому может быть добавлен соответствующий эталон для калибровки химического сдвига (см. ОФС 1.2.1.1.0007.15). В качестве дейтерированного растворителя, как правило, используют дейтерированную воду или буферный раствор в дейтерированной воде. Состав буферного раствора, его pH, концентрация пептида приводят в частной фармакопейной статье.

После помещения в магнит образец термостатируют не менее 5 мин. Регистрацию спектров испытуемого и стандартного образцов проводят в идентичных условиях (одинаковые растворитель, концентрация, температура, параметры эксперимента – ширина спектра, время задержки, число накоплений сигнала спада свободной индукции, количество точек для Фурье-преобразования), которые приводят в частной фармакопейной статье.

Регистрацию спектра при температуре, существенно отличающейся от комнатной, проводят в режиме температурной стабилизации. В противном случае проводят валидацию эффекта температурных изменений на внешний вид спектра.

Проверка идентичности

При установлении подлинности олигопептидов путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным стандартным спектром пики в 2 спектрах должны совпадать по положению, интегральной интенсивности и мультиплетности (см. ОФС 1.2.1.1.0007.15). Характеристические сигналы, уникальные для каждой аминокислоты, должны быть охарактеризованы определёнными химическими сдвигами с соответствующими доверительными интервалами, приведенными в частной фармакопейной статье.

При установлении подлинности полипептидов используют одномерные спектры ^{1}H целиком, как «отпечатки пальца» объекта, без детализации значений химических сдвигов и мультиплетности отдельных сигналов. Рекомендуется проводить сравнение нормированных интегральных интенсивностей характеристичных областей спектров ^{1}H испытуемого и стандартного образцов, содержащих сигналы определенных аминокислотных функциональных групп. Например, сигналы протонов метильных групп алифатических остатков находятся в интервале 0,9 ÷ 1,5 м.д., области сигналов остальных протонов алифатических боковых цепей – 1,5 ÷ 3,5 м.д., протонов α-CH – 3,5 ÷ 4,5 м.д., ароматических протонов, протонов пептидных групп – 6,7 ÷ 9,0 м.д. Характеристическая область протона имидазола в гистидине 8,0 ÷ 9,2 м.д., NH-индольного протона триптофана 9,0 ÷ 11,0 м.д. Области спектра, содержащие сигналы остаточных органических растворителей, не учитывают при проведении нормированного интегрирования. Доверительные интервалы нормированных интегральных интенсивностей характеристичных областей спектров ^{1}H приводят в частной фармакопейной статье.

Установление подлинности олигопептидов при отсутствии стандартных образцов включает в себя идентификацию аминокислот и определение аминокислотной последовательности в пептидной цепи. Идентификацию аминокислот проводят в 3 этапа:

I. соотнесение сигналов спектров ^{1}H и ^{13}C к конкретным углеводородным фрагментам (метильным, метиленовым, метиновым, ароматическим группам) на основе данных спектра ^{1}H-^{13}C HSQC;

II. определение соседних углеводородных фрагментов, связанных ковалентной связью, и составление последовательности из углеводородных фрагментов на основе данных ^{1}H-^{1}H COSY и при необходимости ^{1}H-^{1}H TOCSY;

III. объединение в молекулу углеводородных фрагментов (алифатических и ароматических) и амидных групп на основе данных спектра ^{1}H-^{13}C HMBC.

Аминокислотную последовательность в олигопептиде устанавливают на основе данных спектра ^{1}H-^{13}C HMBC по наличию кросс-пиков между сигналами α-CH групп и C=O групп соседних аминокислот.

Определение маннита (маннитола) в биологических лекарственных препаратах

ОФС.1.7.2.0037.18

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для качественного и количественного определения маннита в биологических лекарственных препаратах с использованием качественной реакции маннита с раствором железа (III) хлорида и метода йодометрического титрования.

Маннит (маннитол), действующим веществом которого является D-маннит, представляет собой многоатомный спирт $C_6H_8(OH)_6$, используемый в качестве вспомогательного вещества в биологических лекарственных препаратах, как стабилизатор и антиоксидант.

Качественная реакция

Метод основан на качественной реакции маннита, содержащегося в препарате, с раствором железа хлорида (III) в щелочной среде.

К испытуемому образцу добавляют 0,5 мл 5 % водного раствора железа (III) хлорида, перемешивают, прибавляют 0,5 мл 5 М раствора натрия гидроксида и вновь перемешивают. В результате взаимодействия маннита с железа (III) хлоридом в щелочной среде должно наблюдаться желто-коричневое окрашивание раствора.

Примечания

1. Приготовление 5 М раствора натрия гидроксида. В фарфоровый стакан вносят 20 г натрия гидроксида и растворяют в небольшом количестве воды, избегая энергичного выделения тепла. После остывания раствор аккуратно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем тем же

растворителем до метки. Раствор готовят непосредственно перед испытанием.

2. Приготовление 5 % водного раствора железа (III) хлорида. 5 г железа (III) хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.
3. Приготовление испытуемых образцов. Образцы готовят в двух параллельных определениях. К испытуемому образцу, содержащему около 160 мг маннитола, добавляют 6 мл воды и перемешивают. Затем полученный раствор разводят в 4 раза водой, тщательно перемешивают и проводят анализ по указанной выше методике.

Метод йодометрического титрования

В три колбы для титрования (параллельные пробы) помещают необходимый объем испытуемого препарата, добавляют 5 мл воды, 20 мл раствора калия перйодата в растворе серной кислоты, перемешивают, закрывают притертыми стеклянными пробками и выдерживают при комнатной температуре в течение 15 мин. В каждую колбу добавляют 5 мл 20 % раствора калия йодида, закрывают притертыми стеклянными пробками и оставляют в защищенном от света месте на 5 мин. Выделившийся йод титруют 0,02 М раствором натрия тиосульфата до соломенно-желтого окрашивания раствора, затем добавляют 5 капель 1 % раствора крахмала в 15 % растворе натрия хлорида (образуется синее окрашивание раствора). Продолжают титрование раствора испытуемого образца до обесцвечивания синей окраски раствора. Параллельно при тех же условиях проводят титрование контрольных образцов, содержащих по 5 мл воды.

Количество маннита (X) мг в 1 мл препарата вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V\Delta \cdot 0{,}3643}{a};$$

где:

V∆ – разность объемов 0,02 М раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование контрольного и испытуемого образца, мл;

0,3643 – количество маннита, эквивалентное 1 мл 0,02 М раствора натрия тиосульфата (мг);

а – объем испытуемого препарата, взятого для анализа, мл

Примечания.

1. Приготовление испытуемого образца. Испытуемый раствор препарата готовят по методике, указанной в нормативной документации с содержанием маннита около 1 мг.
2. 0,02 М раствор натрия тиосульфата. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 20 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.
3. 1% (об.) раствор серной кислоты. В мерный цилиндр вместимостью 50 мл вносят 49,5 мл воды, добавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.
4. Раствор калия перйодата в растворе серной кислоты. В мерной колбе вместимостью 250 мл растворяют 150 мг калия перйодата в 45 мл 1 % раствора серной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используется свежеприготовленным.
5. 20 % раствор калия йодида. 10 г калия йодида растворяют в 20 мл воды в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.
6. 15 % раствор натрия хлорида. 4,5 г натрия хлорида растворяют в мерном цилиндре вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до 30 мл и перемешивают. Раствор хранят при температуре не выше 25 °С в течение 1 мес.
7. 1% раствор крахмала в 15 % растворе натрия хлорида. 0,3 г крахмала растворяют при нагревании в 29,7 мл 15 % раствора натрия хлорида. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

Определение содержания тритона Х-100 методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

ОФС.1.7.2.0038.18

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения содержания тритона Х-100 в биологических лекарственных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Тритон Х-100 (4- (1,1,3,3 - тетраметилбутил) фенил-полиэтиленгликоль) – неионное поверхностно-активное вещество, используется в качестве детергента в процессах инактивации вирусов с липидными оболочками биологических лекарственных препаратов.

Принцип метода обращенно-фазовой ВЭЖХ заключается в распределении компонентов исследуемого образца между полярным элюентом и неполярными группами на поверхности сорбента хроматографической колонки. Основные положения метода обращенно-фазовой ВЭЖХ изложены в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Хроматографические условия

Для проведения хроматографии используют колонку с сорбентом $C_{18.}$

В качестве подвижной фазы применяют смесь ацетонитрил (или метанол): вода с использованием гридиента концентраций или при разделении в изократическом режиме разделения.

Анализ проводят с использованием ультрафиолетового детектора. Выбор длины волны (223 нм или 280 нм) зависит от состава препарата.

Для исключения влияния системных пиков на результаты анализа, хроматографии подвергают растворы подвижной фазы и плацебо.

Условия проведения анализа (тип колонки, состав подвижной фазы, вид элюирования, учёт и интерпретация результатов) должны быть указаны в нормативной документации.

Определение пригодности хроматографической системы

Оценку пригодности хроматографической системы проводят по хроматограммам стандартного раствора.

Если в нормативной документации не указано иное, должны выполняться следующие требования пригодности хроматографической системы:

- величина фактора асимметрии пика тритона Х-100 должна находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- относительное стандартное отклонение площади пика тритона Х-100 не должно превышать 2,0 %;
- время удерживания пика тритона Х-100 на хроматограмме стандартного раствора должно соответствовать времени удерживания соответствующего пика на хроматограмме стандартного раствора.

Содержание тритона Х-100 в препарате должно быть не более 3 мг/мл.

Примечания

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разводят по методике, указанной в нормативной документации. Степень разведения испытуемого раствора зависит от исходного содержания тритона Х-100 и условий проведения анализа. В качестве растворителя используют воду очищенную или подвижную фазу.
Стандартный раствор. В качестве стандартного раствора используют соответствующие стандартные образцы тритона Х-100, разведенные до необходимой концентрации тем же растворителем, что и испытуемый раствор.
Контрольный раствор. Используют серию препарата с известным содержанием тритона Х-100. Процедура разведения должна быть аналогична процедуре, предусмотренной для испытуемого раствора, и указана в нормативной документации.

Метод электрофореза ДНК в агарозном геле	**ОФС.1.7.2.0039.18 Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод электрофореза ДНК в агарозном геле, предназначенный для определения размеров фрагментов ДНК, а также для их разделения по размеру.

Метод электрофореза ДНК в агарозном геле представляет собой разновидность зонального электрофореза, описанного в ОФС «Электрофорез».

Сущность метода заключается в том, что молекулы/фрагменты ДНК, заряженные отрицательно, под действием силы электрического поля движутся от отрицательного электрода − катода («-») к положительному электроду − аноду («+»). Агарозный гель, являясь вязкой средой, препятствует продвижению молекул/фрагментов - образцов ДНК, в связи с этим, короткие фрагменты ДНК движутся к аноду быстрее, чем длинные. Отношение величины заряда нуклеиновых кислот, мало зависящей от pH окружающей среды, к их массе практически одинаково, поэтому метод электрофореза в агарозном геле позволяет оценить только размеры различных фрагментов ДНК.

После проведения электрофореза проводят визуализацию разделенных фрагментов и анализ полученных результатов. Возможно также извлечение фрагментов ДНК из геля для проведения дальнейших исследований.

Методика электрофореза в агарозном геле

Подготовка к проведению анализа

На ровную поверхность устанавливают форму для заливки геля. Не касаясь дна формы (1-2 мм) помещают гребенки на расстоянии 5 см друг от друга или как указано в нормативной документации.

Приготовление буферных растворов

Для приготовления буферных растворов обычно используют готовые составы, входящие в комплекты реагентов для метода электофореза в агарозном геле.

Для приготовления буферных растворов для электрофореза в агарозном геле, как правило, используют трис-боратный (ЭДТА, ТВЕ) или трис-ацетатный (ТАЕ) буферный раствор в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля. Возможно использование других подходящих буферных растворов, которые указывают в нормативной документации. Буферный раствор для электрофореза, как правило, хранят при температуре 18 – 25 ^{o}C в течение 1 нед или при температуре 2 - 8 ^{o}C в течение 1 мес.

В буферный раствор для образцов добавляют специально подобранный краситель, а также глицерин или сахарозу, которые указывают в нормативной документации. Присутствие глицерина или сахарозы облегчает внесение образцов в лунки, а краситель позволяет в режиме реального времени наблюдать продвижение фронта образцов в геле. В качестве красителей используют: бромфеноловый синий, ксиленцианол, крезоловый красный или Orange G. Для каждой концентрации агарозного геля подбирают оптимальный краситель и его концентрацию.

Приготовление геля

Для приготовления агарозного геля в СВЧ-печи или на водяной бане расплавляют до прозрачного состояния необходимое количество смеси агарозы, буферного раствора, не допуская закипания геля. Расплавленную смесь охлаждают до температуры 50 - 60 ^{o}C. Далее с помощью автоматического дозатора добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, тщательно перемешивают и смесь тонким слоем (до 5 мм) заливают на

пластинку так, чтобы зубцы гребенок были погружены не менее, чем на 3 мм, не допуская образования пузырьков воздуха. Агарозный гель застывает в течение 30 – 60 мин при температуре 18 - 25 ^{o}C.

Проведение электрофореза

Камеру для электрофореза заполняют буфером раствором с бромистым этидием, помещают туда пластинку с агарозным гелем и осторожно извлекают гребенку плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

Буферный раствор должен полностью покрыть пластинку с гелем слоем не менее 3-5 мм. Перед внесением в гель подготовленные пробы смешивают с буферным раствором для внесения в таком соотношении, чтобы в конечной пробе была рабочая (1х) концентрация буферного раствора. Полученные растворы вносят в лунки агарозного геля под буферный раствор для электрофореза, камеру для электрофореза закрывают, электроды подсоединяют к источнику тока и включают прибор. Молекулы/фрагменты ДНК одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные зоны. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся от катода («-») к аноду («+»). Постепенно исходный образец ДНК, состоящий из разных макромолекул/фрагментов, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. Процесс электрофореза отслеживают по фронту красителя в геле (заряженного низкомолекулярного вещества, которое входит в состав буферного раствора для внесения). Электрофорез останавливают при приближении красителя к концу пластинки. Необходимо учитывать размер фрагмента ДНК, концентрацию агарозного геля и природу лидирующего красителя, чтобы избежать выхода образца из геля раньше красителя (табл. 1).

Таблица 1- Размеры фрагментов ДНК, имеющих скорость миграции некоторых популярных лидирующих красителей в зависимости от концентрации агарозы.

Концентрация агарозы (%)	Эквивалент для ксиленцианола	Эквивалент для бромфенолового синего
0,5 – 1,5	4-5 тыс. п.о.	400-500 п.о.

2,0 – 3,0	750 п.о.	100 п.о.
4,0 – 5,0	125 п.о.	25 п.о.

[п.о.] – пар оснований

Оценка результатов

Результаты электрофореза ДНК в агарозном геле регистрируют в присутствии бромистого этидия − интеркалирующего соединения, образующего с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-светом с помощью трансиллюминатора. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после проведения электрофореза образуются четкие полосы, расположенные на пластинке одна под другой в соответствии с их размером. Для определения относительной молекулярной массы фрагментов ДНК одновременно с исследуемым образцом проводят электрофорез маркеров макромолекул ДНК с известными молекулярными массами. Набор маркеров должен охватывать весь диапазон молекулярных масс в данной системе. Образец, содержащий маркеры ДНК, вносят в отдельную лунку. Для определения молекулярной массы образца сравнивают его положение в геле относительно положения маркеров. Для удобства возможно построение калибровочного графика зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от Rf (величины, равной отношению расстояний, пройденных маркером и красителем.

Разделение линейных молекул

Для разделения линейных двухцепочечных молекул ДНК используют гели с различной концентрацией агарозы от 0,3 % до 2 %, соответствующие определенному размеру молекул ДНК (табл.2).

Таблица 2. Соотношение гелей с различной концентрацией агарозы и размеров разделяемых фрагментов ДНК.

% агарозы	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,2	1,5	2,0
Размер ДНК [kbp]	5-60	1-30	1-20	0,8-12	0,6-10	0,5-8	0,5-7	0,4-6	0,2-3	0,1-2

[kbp] – 1000 пар оснований ДНК

Нижний предел размеров ДНК определяется в основном диффузией полосы в геле. В гелях с низкой концентрацией агарозы фрагменты ДНК небольших размеров разделяются, но четкость разделения полос невысокая.

Верхний предел размеров ДНК находится в прямой зависимости от напряженности электрического поля, при которой проводится электрофорез. Чем меньше напряженность поля, тем более эффективно можно разделить длинные молекулы ДНК с большей молекулярной массой.

Разделение одноцепочечных ДНК

В процессе разделения в 1% агарозном геле одноцепочечная ДНК в электрическом поле движется быстрее (примерно на 10 %), чем двухцепочечная ДНК того же размера. Однако, одноцепочечная ДНК окрашивается бромистым этидием заметно слабее, чем двухцепочечная (примерно в 4-5 раз). В связи с этим, для получения окраски полос одинаковой интенсивности, необходимо использовать примерно в 5 раз большее количество образца одноцепочечной ДНК.

Для разделения цепей ДНК нужно непосредственно перед электрофорезом прогреть испытуемые образцы около 1 мин при температуре 100 ^{o}C или добавить к образцу раствор натрия гидроксида до получения концентрации 0,1 М раствора и выдержать около 5-10 мин при комнатной температуре или при температуре 37 ^{o}C.

В качестве маркеров для одноцепочечных ДНК возможно использование фрагментов двухцепочечных ДНК с известными размерами, подвергнутых денатурации при высокой температуре, а также коммерческих одноцепочечных маркеров.

Напряжённость электрического поля

При оценке напряженности электрического поля для горизонтального электрофореза принято пренебрегать конкретной геометрией камеры и измерять расстояние непосредственно между электродами.

Для аналитических электрофорезов приемлемое качество сохраняется при напряженности электрического поля до 6 В/см.

ДНК особенно легко теряет бромистый этидий при повышенной температуре. Проведение электрофореза при высоком напряжении электрического поля может достаточно сильно нагреть гель. Но даже при невысоких значениях напряжения в электрическом поле происходит выделение тепла, поэтому следует обеспечивать теплоотвод и стабильность температурного режима (комнатная температура) с целью исключения изменений вязкости геля, проводимости и скорости потока и, следовательно, искажения зон анализируемых компонентов.

Примечания

Приготовление трис-боратного буферного раствора pH 8,0. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 10,8 г трис(гидроксиметил)аминометан, 5,5 г борной кислоты, 4 мл 0,05 М раствора ЭДТА pH 8.0 и 700 мл воды очищенной, перемешивают, доводят объем раствора водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

Приготовление буферного раствора для внесения pH 8,0. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1,25 мл 0,5 % раствора натрия додецилсульфата, 5 мл 0,1 М раствора ЭДТА pH 8.0, 12,5 мл глицерина, 6,25 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Перед использованием отбирают необходимое количество буферного раствора, разводят в 10 раз водой очищенной, добавляют выбранный краситель (например, бромфеноловый синий) до необходимой концентрации, указанной в нормативной документации и перемешивают.

Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб	**ОФС.1.7.2.0040.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб и кандидатов в стандартные образцы (СО) активности аллергенов.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Принцип метода постановки кожных проб

Метод основан на способности кожи человека, сенсибилизированного к определённому аллергену, реагировать на введение этого аллергена развитием местной аллергической реакции немедленного типа (волдырь, гиперемия - накожные пробы) или замедленного типа (папула, гиперемия - внутрикожные пробы).

МЕТОДИКА

Условия проведения кожных проб

Кожные пробы проводятся согласно программе проведения исследований на ограниченной группе лиц врачами-аллергологами в аллергологическом кабинете или аллергологическом отделении больницы.

Подбор пациентов для постановки кожных проб

При оценки специфической активности препаратов формируют основную и контрольную группы лиц в возрасте от 18 до 60 лет.

Основная группа – пациенты, чувствительные к исследуемому аллергену (пациенты с аллергологическими заболеваниями различной этиологии в стадии ремиссии).

Основную группу формируют с учетом анамнестических данных и клинических проявлений заболевания, а также по предварительным результатам кожного тестирования:

- оценка специфической активности **аллергенов** (5-10 чел.) – пациенты, имеющие повышенную чувствительность к тестируемому аллергену (от «+» до «++++»);

- оценка специфической активности и остаточной аллергенности **аллергоидов** (5-10 чел.) – пациенты, имеющие повышенную чувствительность к одноимённому аллергену (не менее «+++» или «++++»);

Контрольная группа (5 чел.) – практические здоровые лица или лица, не имеющие повышенной чувствительности к оцениваемому аллергену.

Испытуемые образцы и материалы

Испытуемая серия препарата аллергена.

Отрицательный контроль:

– тест-контрольная жидкость* – фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий фенол, при оценке специфической активности аллергена;

– разводящая жидкость* - фосфатно-солевой буферный раствор – при оценке специфической активности аллергоидов.

Положительный контроль - 0,01% раствор гистамина**.

– Препарат сравнения – одноимённый аллерген при оценке специфической активности аллергоида.

– Стерильные одноразовые скарификаторы.

– Стерильные одноразовые инъекционные иглы.

– Шприцы одноразовые вместимостью 1 или 2 мл.

– Спирт этиловый 70 %.

– Вата медицинская гигроскопическая.

Примечания

* - выпускаются в комплекте с препаратом;

** - приготовление 0,1% раствора гистамина: к 0,01 г гистамина дигидрохлорида добавляют 10 мл воды для инъекций и перемешивают (раствор годен в течение 1 года при температуре 2-8 ^{0}C).

*** - приготовление 0,01% раствора гистамина: к 1 части 0,1% раствора гистамина дигидрохлорида добавляют 9 частей 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций и перемешивают (раствор годен в течение 6 час с момента приготовления).

Проведение кожных тестов

Кожные пробы с препаратами аллергенов, отрицательным и положительным контролем ставят на внутренней поверхности предплечья, отступив на 5 см от лучезапястного сустава.

Накожные пробы - прик-тест или скарификация

При накожном тестировании аллергены и аллергоиды применяют в номинальной концентрации. Препараты аллергенов, отрицательный и положительный контроли набирают в маркированные стерильные шприцы вместимостью 1 или 2 мл и наносят по 1-ой капле (примерно по 0,1 мл испытуемой и контрольных проб) на расстоянии 30-40 мм друг от друга. Для каждой пробы используют отдельную иглу, ланцет или скарификатор.

Кожные пробы с аллергоидом проводят одновременно с одноимённым аллергеном в равнозначных концентрациях.

Прик-тест/тест-уколом – через капли нанесенных образцов (испытуемой и контрольных проб) производят укол в кожу на глубину 1,0-1,5 мм (инъекционными иглами, укороченными или с ограничением глубины укола, или иглами для прик-теста (ланцетами)). При использовании инъекционных игл прокалывают кожу под углом 45 ^{0} так, чтобы не выступила кровь; затем иглу вынимают, слегка приподнимая кожу.

Скарификация – через капли нанесенных образцов (испытуемой и контрольных проб) проводят параллельно две царапины длиной 5 мм с расстоянием 1-2 мм между ними (стерильными скарификаторами или инъекционными иглами).

Внутрикожные пробы

Проводится оценка специфической активности грибковых и бактериальных аллергенов**.** Концентрация аллергена должна быть не более 1250 PNU/мл.

Аллерген, отрицательный и положительный контроли набирают в маркированные туберкулиновые стерильные шприцы** и вводят внутрикожно по 0,02 мл на расстоянии 40-50 мм друг от друга. При этом, кожу растягивают и вводят иглу под углом 45^0 срезом вниз. Срез иглы должен полностью погрузиться в кожу. После введения 0,02 мл препарата и контролей должна образоваться папула диаметром 1-3 мм.

Примечание

** из шприца необходимо удалять пузырьки воздуха, т.к. появление волдыря при внутрикожном введении можно принять за положительную реакцию; нарушение техники проведения внутрикожных проб, например, внутрикожное введение более 0,02 мл раствора, приводит к развитию ложноположительных реакций.

Учёт результатов

Накожные пробы

Кожную реакцию учитывают через 20 мин. Полученные результаты каждого измерения интерпретируют согласно схеме, приведенной ниже (табл.1).

Таблица 1- Схема учета накожных реакций

Оценка реакции		Размер и характер реакции
Отрицательная	(–)	Отсутствие волдыря (папулы), гиперемия как в контроле с тест-контрольной жидкостью
Положительная	(+)	Волдырь (папула) 2-3 мм, заметен только при натягивании кожи, гиперемия
Положительная	(++)	Волдырь (папула) 4-5 мм, гиперемия – скарификация; Волдырь (папула) 4-10 мм, гиперемия – прик-тест

Положительная	(+++)	Волдырь (папула) 6-10 мм, гиперемия или волдырь 6-10 мм с псевдоподиями, гиперемия – скарификация; Волдырь (папула) 11-15 мм, гиперемия – прик-тест
Положительная	(++++)	Волдырь (папула) более 10 мм, гиперемия или волдырь (папула) более 10 мм с псевдоподиями, гиперемия – скарификация; Волдырь (папула) более 15 мм с псевдоподиями, гиперемия – прик-тест

Внутрикожные пробы

Результаты учитывают через 20 мин и 24 ч, измеряя размеры инфильтрата (папулы) и гиперемии в мм. Результаты регистрируют согласно прилагаемым табл. 2 и 3.

Таблица 2-Схема учета внутрикожных реакций через 20 мин

Оценка реакции		Размер и характер реакции	
		Инфильтрат	Гиперемия
Отрицательная	(–)	Папула не более1-3 мм	Отсутствует
Положительная	(+)	Папула 4-8 мм	Гиперемия
Положительная	(++)	Папула 9-15 мм	Гиперемия
Положительная	(+++)	Папула более 15 мм или папула более 15 мм с псевдоподиями	Гиперемия

Таблица 3 - Схема учета внутрикожных реакций через 24 ч

Оценка реакции		Размер и характер реакции	
		Инфильтрат	Гиперемия
Отрицательная	(–)	Папула не более1-3 мм	Отсутствует
Положительная	(+)	Папула 8-19 мм	В пределах инфильтрата и

			более
Положительная	(++)	Папула 20-29 мм	В пределах инфильтрата и более
Положительная	(+++)	Папула не менее 30 мм	В пределах инфильтрата и более

Критерии приемлемости кожных проб

Реакция кожи на гистамин (положительный контроль) должна быть положительной, при отрицательной реакции – результаты кожных проб у испытуемого лица не учитывают.

Реакция кожи на тест-контрольную и разводящую жидкости должна быть отрицательной, при положительной реакции – результаты кожных проб у испытуемого лица не учитывают.

Интерпретация результатов

Специфическая активность препаратов аллергенов

Препараты аллергенов будут считаться специфически активными, при выявлении положительных кожных проб не менее чем у 3-х из 5-ти обследованных лиц основной группы. В контрольной группе на испытуемый препарат не должно быть зарегистрировано ни одной положительной реакции.

При регистрации положительных реакций у меньшего количества лиц основной группы проводят постановку кожных проб дополнительно еще на 5 пациентах. Положительные реакции должны быть выявлены не менее, чем у 5 из 10 лиц основной группы.

Препараты не будут считаться специфически активными, если положительные кожные реакции зарегистрированы менее, чем у 5-ти из 10-ти лиц основной группы или, если выявлена хотя бы одна положительная кожная реакция у лиц контрольной группы.

Остаточная аллергенность

Аллергенная активность аллергоидов будет считаться сниженной, когда в условиях одномоментной постановки с одноименным аллергеном при равнозначной концентрации по белковому азоту будут зарегистрированы кожные реакции не менее, чем у 3 из 5 или у 5 из 10 обследованных лиц с выраженностью реакции в 1,5 и более раза меньше по размеру волдыря, чем на одноименный аллерген.

В случае, когда зарегистрирована отрицательная кожная реакция на аллергоид, за величину, характеризующую снижение аллергенности последнего, принимают количественное выражение размера волдыря на аллерген (например, если размер волдыря на аллерген равен 3 мм, то остаточная аллергенность аллергоида снижена в 3 раза).

Определение аллергенной активности кандидатов в СО***

Для кандидатов в СО отбираются серии аллергенного экстракта или готового препарата в виде водно-солевого раствора. Кандидаты в СО должны быть стерильны и нетоксичны, охарактеризованы по содержанию белкового азота, при этом исходная концентрация кандидата в СО не должна превышать 16000 PNU/мл.

Примечание

*** СО предназначены для определения аллергенной активности, методами конкурентного иммуноанализа с использованием аллергенспецифических IgE-антител. Аллергенную активность первой серии СО определяют методом кожных проб, последующей – методом конкурентного иммуноанализа в сравнении с предыдущей серией или Международным стандартным образцом (МСО).

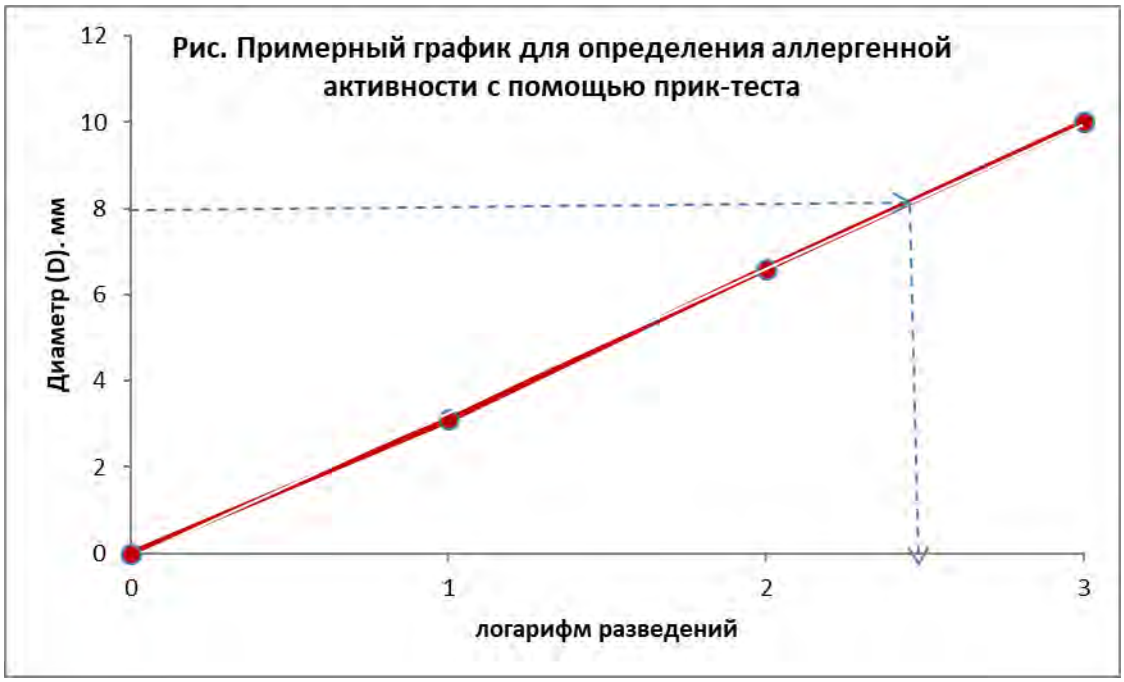
Аллергенную активность кандидатов в СО определяют прик-тестом согласно требованиям к проведению кожных проб, изложенным выше. Кандидат в СО аллергена тестируется не менее, чем в 3-х разведениях у каждого пациента. Одновременно должны быть проведены пробы с отрицательным и положительным контролем.

Основная группа (10 чел.) – пациенты, у которых выраженность кожной реакции на одноименный аллерген соответствует размеру волдыря - 7-9 мм.

Контрольная группа (5 чел.) – практические здоровые лица или лица, не имеющие повышенной чувствительности к оцениваемому аллергену.

Кожную реакцию (прик-тест) учитывают через 20 мин., измеряя ортогональные (максимальный и минимальный) диаметры (D). Полученные значения суммируют и делят на 2. Вычисляют среднее арифметическое и коэффициент вариации для каждого их 3-х разведений аллергена (N=10).

С помощью программы MS Excel или другой подходящей программы, позволяющей вычислять R^2 и уравнение, строят график зависимости выраженности реакции (диаметра волдыря) от выбранных разведений аллергена в логарифмах. Восстанавливают перпендикуляр до пересечения с графиком из точки со значением D равным 8 мм (ось Y); затем опускают перпендикуляр на ось X (логарифм разведений) и определяют соответствующее разведение аллергена (рисунок). Конкретное значение разведения вычисляют с помощью уравнения, описывающего график, где «y=8».



Аллергенную активность препарата выражают в единицах аллергенной активности (ЕАА). В качестве активности 100 000 ЕАА принимается значение то разведение аллергена, которое вызывает развитие кожной реакции у сенсибилизированных лиц (основная группа) в виде волдыря размером 8 мм.

Критерии приемлемости

1. См. «п. Критерии приемлемости кожных проб».

2. Коэффициент вариации (CV) – не более 20 %, коэффициент детерминации или величина достоверности аппроксимации (R^2) – не менее 0,95.

Лекарственные препараты из плазмы крови человека **ОФС.1.8.1.0001.15**

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 и 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 инактивации 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», «pH», «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 «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле», методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия 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».

Х**ранение.** Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье.

Иммуноглобулины человека **ОФС.1.8.1.0003.15**

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. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием белков против сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в

агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека. Метод определения указывают в фармакопейной статье или в нормативной документации.

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 белков сыворотки крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез 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±1)°С 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 апирогенным 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-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 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».

Х**ранение.** В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные **ОФС.1.8.1.0004.15**

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 определение 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 менее 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 «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных».

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 8ºС. Жидкие лекарственные средства не допускается замораживать.

Кровезаменители **ОФС.1.8.1.0005.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на лекарственные препараты, относящиеся к кровезаменителям.

Кровезаменители – лекарственные препараты, применяемые с целью возмещения дефицита крови и коррекции патологических состояний организма человека.

Кровезаменители представляют собой препараты в лекарственных формах для парентерального применения (растворы для инфузий, эмульсии для инфузий), предназначенные преимущественно для внутрисосудистого (внутривенного) введения.

По функциональным свойствам и преимущественной направленности лечебного действия кровезаменители подразделяют на несколько групп.

Гемодинамические (противошоковые) кровезаменители – предназначены для восстановления нарушений гемодинамики, в том числе микроциркуляции крови, для лечения шока различного происхождения и др.

К этой группе относят:

- *лекарственные препараты на основе декстрана:* среднемолекулярные (молекулярная масса 50000-70000 Да) и низкомолекулярные (молекулярная масса 35000-45000 Да);

- *лекарственные препараты на основе производных желатина,* в том числе частично расщепленного с образованием аминокислот;

- *лекарственные препараты на основе производных гидроксиэтилкрахмала:* высокомолекулярные (молекулярная масса 180000-220000 Да) и среднемолекулярные (молекулярная масса 115000-145000 Да);

- *лекарственные препараты на основе полиэтиленгликоля* (молекулярная масса 17000-23000 Да).

Дезинтоксикационные кровезаменители – предназначены для связывания и выведения токсинов, циркулирующих в крови, при интоксикациях различной этиологии (отравлениях, токсикозах, ожоговой болезни, радиационных поражениях) и др. К этой группе относят:

- *лекарственные препараты на основе низкомолекулярного поливинилпирролидона* (молекулярная масса 6000-12000 Да).

Препараты для парентерального питания – предназначены для особой формы внутривенного лечебного питания, обеспечивающего коррекцию нарушенного метаболизма при различных патологических состояниях, путем доставки необходимых питательных веществ ко всем органам и тканям организма. К этой группе относят лекарственные препараты, содержащие необходимые белковые, жировые, углеводные компоненты питания, а также витамины макро- и микроэлементы:

- *белковые гидролизаты* – представляют собой препараты, содержащие смесь аминокислот и низкомолекулярных пептидов, полученных путем гидролиза казеина, белков крови крупного рогатого скота, эритроцитов и крови доноров;

- *аминокислотные смеси* – представляют собой сбалансированные смеси кристаллических незаменимых и некоторых заменимых аминокислот и пептидов, в оптимальных для усвоения соотношениях;

- *жировые эмульсии* – представляют собой эмульсии соевого, хлопкового или кукурузного масла типа «масло в воде»;

- *углеводы и спирты* – представляют собой препараты, в том числе, комбинированные, содержащие моносахариды (например, глюкозу, фруктозу), многоатомные спирты (например, сорбитол).

Регуляторы водно-солевого баланса и кислотно-основного баланса – предназначены для коррекции нарушений водно-электролитного обмена и кислотно-основного состояния (метаболического ацидоза), для восстановления и поддержания осмотического давления в интерстициальном пространстве при кровопотерях и в других случаях обезвоживания организма, вызванных, например, диареей, отеком мозга, токсикозом и др. К этой группе относят солевые растворы и препараты, оказывающие осмодиуретическое действие:

- с*олевые электролитные лекарственные препараты* – представляют собой растворы электролитов, которые, в свою очередь, подразделяют на:

- растворы, соответствующие плазме крови по электролитному составу, pH и осмолярности (так называемые, *базисные растворы*);

- растворы, отличающиеся от плазмы крови по электролитному составу, pH и осмолярности (так называемые, *корригирующие растворы*);

- о*смотические диуретики* – представляют собой растворы веществ (например, многоатомных спиртов манитола или сорбитола), повышающих осмотическое давление плазмы крови, тем самым способствуя притоку жидкости в кровяное русло.

Кровезаменители с функцией переноса кислорода – переносчики газов крови, предназначены для замещения основной функции крови – кислороднотранспортной, для обеспечения доставки кислорода к клеткам ишемизированных тканей в условиях нарушенного микрокровотока при больших кровопотерях, обширных операциях и др. К этой группе относят:

- *препараты модифицированного гемоглобина*, которые увеличивают содержание гемоглобина в циркулирующей крови за счет образования химических соединений с кислородом;

- *эмульсии перфторуглеродов,* которые представляют собой препараты для восполнения кровопотери за счет растворения кислорода и других газов (например, углекислого газа) и пассивного переноса кислорода и газов

пропорционально перепаду парциального давления кислорода или соответствующего газа;

- *инфузионные антигипоксанты,* которые предназначены для повышения энергетического потенциала клетки при гиповолемических состояниях. К таким препаратам относят инфузионные солевые растворы, содержащие производные яблочной или янтарной кислоты, которые восстанавливают клеточный метаболизм, адаптируя клетки к недостатку кислорода; восстанавливают цикл Кребса и способствуют утилизации жирных кислот и глюкозы клетками, нормализуют кислотно-основной баланс и газовый состав крови.

Кровезаменители комплексного действия – обладают расширенным диапазоном действия, представляют собой полифункциональные лекарственные препараты, обеспечивающие одновременно или последовательно два или несколько направленностей лечебного действия, в соответствии с которыми выделяют:

- *препараты гемодинамического и дезинтоксикационного действия;*
- *препараты гемодинамического и гемопоэтического действия;*
- *препараты гемодинамического и реологического действия* и др.

В зависимости от химического состава действующих веществ выделяют белковые, углеводные, жировые, спиртовые, электролитные, комплексные кровезаменители.

Растворы кровезаменителей в зависимости от степени дисперсности подразделяют на кристаллоидные (солевые) и коллоидные, а также коллоидно-солевые растворы.

Приведенные классификации кровезаменителей имеют условный характер, так как препарат одновременно может быть и в той, и в другой группе.

ПРОИЗВОДСТВО

Все кровезаменители должны быть стерильными. Методы и условия стерилизации лекарственных препаратов кровезаменителей должны соответствовать требованиям ОФС «Стерилизация».

Особенности технологии кровезаменителей, которые должны соблюдаться при их производстве регламентированы ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Кровезаменители должны обладать физико-химическими свойствами, близкими к показателям плазмы крови.

Изоионичность кровезаменителей должна соответствовать ионному составу плазмы крови: кроме ионов натрия и хлора – основных компонентов солевой части плазмы, препараты должны содержать и другие ионы (калия, кальция, магния и др.) в определенном соотношении.

Кровезаменители должны быть изогидричными: оптимальное значение pH должно находиться в интервале 5,0-7,0.

Изотоничными являются кровезаменители, осмотическое давление которых соответствует осмотическому давлению плазмы крови 7,7 атм. Препараты, осмотическое давление которых ниже 7,7 атм. относят к гипотоническим, а осмотическое давление которых выше 7,7 атм. – к гипертоническим.

Изоосмолярными называют кровезаменители, осмолярность которых составляет 290-310 мОсм/л.

Изовязкостные препараты – препараты, вязкость которых соответствует вязкости плазмы крови 1,51-1,65 сП.

К лекарственным препаратам – кровезаменителям предъявляются следующие требования:

- должны полностью выводиться из организма, не повреждая тканей, не нарушая функции органов, или должны полностью метаболизироваться ферментными системами организма;

- не должны вызывать выработку антител и вызывать сенсибилизацию организма при повторных введениях;

- быть относительно инертными к системе гемостаза; не кумулировать в организме пациента;

- быть иммуноинертными и др.

Необходимые свойства и требуемые показатели кровезаменителей обеспечиваются выбором фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ.

Фармацевтические субстанции, используемые для получения лекарственных препаратов кровезаменителей, должны отвечать требованиям, предъявляемым к субстанциям для получения лекарственных форм для парентерального применения в соответствии с ОФС «Фармацевтические субстанции».

При использовании для производства кровезаменителей исходного сырья и материалов, полученных из тканей или секретов животных и человека (например, производные желатина, декстран, белковые гидролизаты, аминокислотные смеси и др.), необходимо оценить риски контаминации сырья и материалов вирусами в соответствии с ОФС «Вирусная безопасность» и/или губчатой энцефалопатией животных в соответствии с ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств».

Вспомогательные вещества, используемые при получении кровезаменителей, указаны в ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Кровезаменители не должны содержать антимикробных консервантов и антибиотиков.

Кровезаменители упаковывают в стеклянную или полимерную упаковку. В процессе производства кровезаменители, упаковываемые в полимерную упаковку, должны быть подвергнуты испытаниям на соответствие требований показателей «Абсорбция в ультрафиолетовой

области спектра», «Восстанавливающие вещества», «Гемолитически действующие вещества».

ИСПЫТАНИЯ

Проводимые испытания для кровезаменителей должны учитывать специфику каждого конкретного лекарственного препарата.

Кровезаменители должны выдерживать общие требования, предъявляемые к лекарственным препаратам и лекарственным формам в соответствии с ОФС «Лекарственные формы», а также требования, предъявляемые к инфузионным растворам в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Описание. Указывают внешний вид и основные органолептические и другие свойства лекарственной формы кровезаменителя.

Подлинность. Подлинность действующих и вспомогательных веществ (антиоксидантов, стабилизаторов и др.) кровезаменителей подтверждают физико-химическими (хроматографическими, спектрометрическими и др.) и химическими методами анализа, позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат.

Кровезаменители, представляющие собой растворы для инфузий, контролируют по показателям **«Прозрачность», «Цветность»** в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ОФС «Степень окраски жидкостей» или в соответствии с указаниями фармакопейных статей или нормативной документации.

pH. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» и нормативными значениями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вязкость. Кровезаменители, содержащие высокомолекулярные соединения и/или представляющие собой вязкие препараты (например, производные желатина, декстрана, гидроксиэтилкрахмала и др.) контролируют по показателям «Относительная вязкость», «Характеристическая вязкость» и др. в соответствии с требованиями

ОФС «Вязкость» и нормативными значениями, указанными в фармакопейных статьях или нормативной документации.

Средняя молекулярная масса. Молекулярно-массовое распределение. Испытание проводят для кровезаменителей, представляющих собой высокомолекулярные соединения методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») или другим методом. Методика анализа, нормативные значения показателей должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Плотность. Испытание проводят для жировых эмульсий в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» и нормативными значениями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Видимые механические включения. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые механические включения. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Размер частиц. Испытание проводят для кровезаменителей, представляющих собой эмульсии для инфузий, в соответствии с методикой и нормативными значениями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Бактериальные эндотоксины или Пирогенность. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» или ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Испытание проводят для кровезаменителей, для производства которых использованы вещества, получаемые из крови, органов, тканей человека или животного, растительного сырья, микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, а

также для кровезаменителей в упаковках из полимерных материалов и в других случаях, если это указано в фармакопейной статье или нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Аномальная токсичность».

Стерильность. Все кровезаменители должны выдерживать испытание на стерильность в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Осмоляльность. Для кровезаменителей, представляющих собой растворы для инфузий, рассчитывают значение теоретической осмолярности. В случае если теоретическая осмолярность не может быть рассчитана, должно быть определено среднее значение осмоляльности в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Извлекаемый объем. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Для контроля возможного присутствия примесей некоторые кровезаменители должны быть подвергнуты дополнительным испытаниям в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации.

5-гидроксиметилфурфурол. Испытание проводят спектрофотометрическим методом для кровезаменителей, содержащих глюкозу (декстрозу).

N-винилпирролидон. Испытание проводят титриметрическим методом для кровезаменителей, содержащих низкомолекулярный поливинилпирролидон.

Этанол. Испытание проводят методом газовой хроматографии или другим методом для кровезаменителей, содержащих, например, декстран.

Тяжелые металлы. Испытание проводят для кровезаменителей, для получения которых использованы вещества (фармацевтические субстанции, вспомогательные материалы и др.), содержащие примеси тяжелых металлов. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые

металлы».

Количественное определение. Испытание проводят для действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав кровезаменителей (обязательно – для антимикробных консервантов, антиоксидантов, для других вспомогательных веществ – при соответствующих указаниях). Для определения применяют титриметрические методы (определение ионов магния, кальция, хлора и др. в солевых препаратах, определение маннитола и др.); метод Къельдаля (определение азота в препаратах, содержащих белки, аминокислоты и др.), рефрактометрический метод (определение глюкозы, поливинилпирролидона и др.), поляриметрический метод (определение декстрана, глюкозы, гидроксиэтилкрахмала и др.), метод газовой хроматографии (определение этанола в противошоковых препаратах, определение триглицеридов и других соединений в жировых эмульсиях и др.), спектрометрические методы (атомно-абсорбционной пламенной, атомно-эмиссионной пламенной для определения ионов кальция, магния, натрия, калия и др. в солевых препарата; спектрофотометрический для определения полиэтиленгликоля и др.), метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (определение α-токоферола в жировых эмульсиях, определение аминокислот в аминокислотных смесях и др.), а также другие методы и методики с указанием нормативных требований в соответствии с фармакопейной статьей или нормативной документацией на конкретный лекарственный препарат.

УПАКОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Система упаковки, включающая упаковку кровезаменителя совместно с медицинскими изделиями, предназначенными для его введения в организм человека (инфузионного, трансфузионного и др.), должна быть одноразового применения.

МАРКИРОВКА

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В стерильной упаковке, обеспечивающей стабильность лекарственного препарата-кровезаменителя в течение указанного срока годности, в защищенном от света месте при температуре от 2 до 25 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Факторы свертывания крови человека	**ОФС.1.8.1.0006.18**
(генно-инженерные, рекомбинантные)	**Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на рекомбинантные факторы свертывания крови (РФСК) человека, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

Рекомбинантный фактор свертывания крови (РФСК) представляет собой лиофилизированный препарат гликопротеинов, обладающий биологической активностью фактора свёртывания крови, выделенного из плазмы и предназначенный для заместительной терапии при заболеваниях, связанных с нарушениями системы свертывания крови.

Серьезным осложнением заместительной терапии является выработка ингибирующих антител. На фоне данной проблемы существенным достоинством РФСК является возможность разработки модифицированных белков, сохраняющих активность эндогенных факторов, но отличных от них по структуре, что позволяет существенно снизить индукцию ингибирующих антител. В качестве других преимуществ РФСК по сравнению с плазменными факторами можно отметить высокую активность, чистоту, безопасность, независимость производства от донорской плазмы.

РФСК представлены препаратами на основе VII рекомбинантного активированного фактора свертывания крови (rFVIIa), VIII рекомбинантного фактора свертывания крови (rFVIII) и IX рекомбинантного активированного фактора свертывания крови (rFIXa).

Структура белковой молекулы РФСК может как совпадать, так и отличаться от структуры аналогичного фактора свертывания крови, выделенного

из плазмы, при условии сохранения биологической активности препарата. Аминокислотная последовательность и значимые посттрансляционные модификации молекулы РФСК должны быть полностью охарактеризованы. На основании структуры белковой молекулы должна быть установлена принадлежность препарата к имеющимся международным непатентованным наименованиям или, в случае разработки оригинальной структуры, ей должно быть присвоено отдельное международное непатентованное наименование.

Факторы свертывания крови VII, VIII и IX, циркулирующие в плазме, представляют собой двухцепочечные (в активированной форме) гликопротеины с доменной структурой и сложным профилем гликозилирования. Молекула фактора свертывания крови VII состоит из 406 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 50 кДа, молекула фактора свертывания крови VIII состоит из 2332 аминокислотных остатков с молекулярной массой от 170 до 280 кДа, молекула фактора свертывания крови IX – из 381 аминокислотного остатка с молекулярной массой около 57 кДа.

Рекомбинантные факторы свертывания крови представлены рядом модифицированных форм, получивших следующие международные непатеновованные наименования: РФСК VIIa (rFVIIa) - Эптаког альфа; РФСК VIII (rFVIII) – Октоког альфа, Мороктоког альфа, Симоктоког альфа, Бероктоког альфа и Туроктоког альфа; РФСК IXa (rFIXa) – Нонаког альфа.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство РФСК осуществляется с применением технологии рекомбинантной ДНК и должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики.

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, производство лекарственного средства, включая банки штаммов-продуцентов, должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Основными клеточными линиями при производстве РФСК являются эукариотические клетки млекопитающих. Производство основано на системе банков клеток-продуцентов – Главного банка клеток (ГБК) и Рабочего банка клеток (РБК).

Используемые в процессе производства РФСК клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы в объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратах» и ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Очищенный белок должен быть охарактеризован в соответствии с ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Качество препарата контролируется с помощью одного или более стандартных образцов, аттестованных в установленном порядке или с использованием соответствующих международных стандартных образцов.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве стандартного образца может быть использована типичная серия готового продукта, охарактеризованная по всем показателям качества, а при необходимости – и по дополнительным показателям, аттестованная в установленном порядке по соответствующему международному стандартному образцу при наличии последнего.

Испытания фармацевтической субстанции или конечного балка биологической фармацевтической субстанции для хранения должны проводиться в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», если не обосновано иное.

Описание. Субстанция (конечный балк) должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность должна быть подтверждена с помощью комплекса методов, позволяющих специфически идентифицировать РФСК с использованием стандартных образцов. Субстанция (конечный балк) должна обладать биологической активностью соответствующего фактора свертывания крови, выделенного из плазмы, и определяться обоснованным методом, например, коагулометрическим методом или методом хромогенного субстрата.

Должна быть подтверждена структура белковой молекулы и ее посттрансляционные модификации с применением пептидного картирования, карбогидратного картирования, а также дополнительных физико-химических методов исследования: электрофорезом в полиакриламидном геле, изоэлектрическим фокусированием, обращенно-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией, методом масс-спектрометрического анализа и др.

Испытания проводят любой пригодной методикой, например, методикой, основанной на методах, изложенных в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», ОФС «Определение белка» ОФС «Капиллярный электофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот» и др., если применимо. Выбор дополнительных методов должен быть обоснован. Структура молекулы и ее гликопрофиль должны соответствовать стандартному образцу. Поскольку посттрансляционная модификация, заключающаяся в гликозилировании белка, может быть стандартизована только в рамках одной конкретной технологии, гликопрофиль может быть индивидуальным. Для подтверждения качества субстанции необходимо установление существующих различий профиля

гликозилирования относительно международного стандартного образца или оригинального препарата, подробное их описание и предоставление сведений в регистрационном досье об отсутствии влияния данных отличий на эффективность препарата (сохранение активности соответствующего ФСК) и безопасности препарата (на стадии доклинических исследований). Для оценки данного показателя необходимо наличие внутреннего стандартного образца с установленным профилем гликозилирования и характеристикой референсных пиков.

Описание конкретной методики должно быть приведено в фармакопейной статье или нормативной документации на фармацевтическую субстанцию. Методики должны быть валидированы.

Прозрачность. Субстанция (конечный балк) должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Субстанция (конечный балк) должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Субстанция (конечный балк) должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Количественное определение. Количественное определение должно состоять из количественного определения активности РФСК, количественного определения целевого белка и кальция (если применимо). Рассчитанная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % от номинальной активности. Доверительные интервалы (P = 0,95) должны быть не менее 80 % и не более 120 % рассчитанной активности. Содержание белка должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или норматив-

ной документации на субстанцию. Испытания проводят любой пригодной методикой, например, методикой, основанной на методах, изложенных в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», ОФС «Определение белка» или в соответствии с валидированной методикой, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации на фармацевтическую субстанцию. Выбор метода определения белка должен быть обоснован. Количественное определение может проводиться одновременно с подтверждением подлинности.

Количественное определение кальция, если нет других указаний в нормативной документации, проводят методом с достаточной чувствительностью, например, методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

Чистота. Родственные соединения. Содержание родственных соединений и посторонних примесей в субстанции (конечном балке) оценивают обоснованными методами, например, методом обращенно-фазовой или эксклюзионной ВЭЖХ или методом электрофореза. Испытания проводят любой пригодной методикой, например, методикой, основанной на методах, изложенных в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Хроматография», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». Комплекс методов должен зависеть от структурных особенностей целевого белка и максимально полно отражать их специфику. Нормативные требования и методика испытаний должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Чистота. Посторонние примеси. Остаточные белки клетки-хозяина. Содержание белков щтамма-продуцента должно быть не более 200 нг на мг белка**.** Остаточные белки клетки-хозяина могут быть определены иммунохимическими методами (например, радиоиммунологическим или ИФА). Методика должна быть приведена в нормативной документации на субстанцию.

Данное испытание обязательно для фармацевтической субстанции, вносимой в государственный реестр лекарственных средств.

В случае если используемая для производства фармацевтическая субстанция не предназначена для реализации и включения в государственный реестр лекарственных средств РФ, испытания проводятся с использованием конечного балка, в нормативной документации на лекарственный препарат приводится указание о гарантии качества ЛС по данному показателю.

Остаточная ДНК штамма-продуцента. Приводят нормы по содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента. Возможно применение готовых наборов реагентов с использованием валидированной методики на основе молекулярной гибридизации, полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа.

Содержание остаточных белков клеток-хозяина и ДНК штамма-продуцента не должно превышать значений, установленных в фармакопейной статье или в нормативной документации, и показателей, определенных международными требованиями к данной группе препаратов.

Оценка показателя обязательна для фармацевтической субстанции, вносимой в государственный реестр лекарственных средств.

В случае если используемая для производства фармацевтическая субстанция не предназначена для реализации и включения в государственный реестр лекарственных средств РФ, испытания проводятся с использованием балка субстанции для хранения, в нормативной документации на лекарственный препарат приводится указание о гарантии качества ЛС по данному показателю и предел допустимого содержания на 1 дозу препарата.

Остаточные количества гетерологичных примесей белковой природы (бычий сывороточный альбумин). Остаточные количества гетерологичного белка, наличие которого может быть обусловлено технологий производства, должно быть определено количественно пригодным методом, например, методом иммуноферментного анализа. Сведения о пределе содержания гетерологичных примесей и стабильности производства в отношении

показателя должны быть приведены в досье на фармацевтическую субстанцию.

В случае если используемая для производства фармацевтическая субстанция не предназначена для реализации и внесения в государственный реестр лекарственных средств РФ, оценку показателя проводят с использованием конечного балка. Сведения о пределе содержания гетерологичных примесей и стабильности производства в отношении показателя должны быть приведены в досье на препарат.

Микробиологическая чистота. Субстанция (конечный балк) до стерилизующей фильтрации должна выдерживать требования, предъявляемые к фармацевтическим субстанциям, предназначенным для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Стерильность. Субстанция (конечный балк) должна быть стерильной, если хранится после стерилизующей фильтрации. Испытания стерильности проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Указывают допустимое содержание бактериальных эндотоксинов и метод определения. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию, или указано для конечного балка в досье на препарат. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» по указанному в нормативной документации методу.

Пирогенность (если применимо). Субстанция должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Данное испытание обязательно для фармацевтической субстанции, вносимой в государственный реестр лекарственных средств. Субстанция должна быть нетоксична. Испытания проводят в соот-

ветствии с ОФС «Аномальная токсичность», тест для иммунобиологических лекарственных препаратов (испытание на белых мышах), если нет других указаний в нормативной документации.

Время получения восстановленного раствора субстанции лиофилизированной (растворимость).

Указывают время растворения препарата, приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения.

Потеря в массе при высушивании или содержание воды. Указывают требования к потере в массе при высушивании или содержанию воды в субстанции лиофилизироанной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды методом Фишера».

Производственный штамм. Указывают штамм-продуцент, его морфологические особенности и др., регулярность контроля основных показателей.

Транспортирование, хранение. В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Качество препарата контролируется с помощью одного или более стандартных образцов, аттестованных в установленном порядке или с использованием соответствующих международных стандартных образцов.

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве стандартного образца может быть использована типичная серия готового продукта, охарактеризованная по всем показателям качества, а при необходимости и по дополнительным показателям, аттестованная в установленном порядке по соответствующему международному стандартному образцу при наличии последнего.

Лекарственные препараты на основе РФСК выпускают в форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций.

Требования к испытаниям лекарственных препаратов РФСК регламентируются нижеприведенными показателями, а также требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Если технология производства РФСК построена по принципу непрерывного цикла без получения субстанции как самостоятельного продукта или отдельного этапа производства, то испытания, предусмотренные для субстанции, должны проводиться для конечного балка.

Описание. Приводится описание свойств лекарственной формы препарата. Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации.

Подлинность. Подлинность подтверждается комплексом (2-3) взаимодополняющих методов (один из которых – определение специфической активности), позволяющих специфически идентифицировать РФСК с использованием стандартных образцов. Для подтверждения структуры белка могут быть использованы следующие физико-химические методы: изоэлектрическое фокусирование, обращенно-фазовая и эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография и другие методы с доказанной специфичностью.

Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат. Для испытаний могут использоваться методики, основанные на методах, изложенных в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», ОФС «Определение белка» ОФС «Капиллярный электофорез», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Определение подлинности и чи-

стоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот» и др., если применимо.

Время растворения (Растворимость).

Указывают допустимую норму. Определяют визуальным методом. При необходимости описывают методику.

Прозрачность. Указывают требования по прозрачности раствора. Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Указывают требования по цветности раствора. Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Лекарственный препарат должен соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Герметичность (если применимо в готовом препарате). Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Методика испытания должна быть приведена в нормативной документации.

Осмолярность (Осмоляльность) (если применимо). Лекарственный препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать.

Определение невидимых частиц проводят в соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». В нормативной документации указывают допу-

стимое содержание невидимых механических включений и метод(ы), используемый(е) для проведения испытания.

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси (если применимо). Чистота препарата оценивается комплексом взаимодополняющих методов (не менее 2-3), выбор которых должен быть обоснован. Требования по содержанию родственных соединений и посторонних примесей должны гарантировать безопасность и эффективность лекарственного препарата.

Содержание родственных соединений может определяться с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; изоэлектрофокусирования; обращено-фазовой и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии и других методов с доказанной специфичностью и точностью.

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

Методики испытания и соответствующие требования должны быть приведены в нормативной документации на лекарственный препарат.

Производитель лекарственного препарата должен гарантировать, что содержание посторонних примесей (остаточных белков клетки-хозяина, ДНК штамма-продуцента и других возможных гетерологичных примесей) не превышает установленную норму. Норма должна быть обоснована и соответствовать международным требованиям к чистоте препаратов, предназначенных для длительного введения.

Стерильность. Лекарственный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации. В нормативной документации должно быть указание о наличии/отсутствии антимикробного действия препарата в условиях проведения испытания». В случае проведения испытания методом прямого посева должны быть указаны питательные среды для проведения испытаний, соотношение количества испытуемого препарата и питательной

среды, условия инкубации. Для метода мембранной фильтрации при необходимости должна быть приведена методика пробоподготовки препарата к испытанию с указанием промывочной жидкости и количества промывок мембраны.

Бактериальные эндотоксины. Указывают допустимое содержание бактериальных эндотоксинов и метод(ы) определения. Содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на препарат. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» по указанному в нормативной документации методу.

Аномальная токсичность. Лекарственный препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», тест для иммунобиологических лекарственных препаратов (испытание на белых мышах).

Количественное определение. Количественное определение должно состоять из количественного определения активности РФСК и количественного определения целевого белка. Рассчитанная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % номинальной. Доверительные интервалы (P = 0,95) должны быть не менее 80 % и не более 120 % рассчитанной активности. Содержание белка должно соответствовать нормам, определенным в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию. Испытания проводят любым пригодным методом, например, в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Хроматография», ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области», ОФС «Определение белка» или в соответствии с валидированной методикой, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации. Выбор метода определения белка должен быть обоснован. Количественное определение может проводиться одновременно с подтверждением подлинности и специфической активности.

Вещества, вносимые в препарат. Устанавливают норму содержания и определяют количественное содержание веществ, используемых в качестве стабилизаторов, любым пригодным фармакопейным методом или с помощью валидированной методики производителя.

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Транспортирование, хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С в системе «холодовой цепи», не допускается замораживание. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Контролируемые условия, обоснованные исследованиями по стабильности препарата, указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека	ОФС.1.8.1.0007.18 Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья содержит общие требования к мерам по обеспечению вирусной безопасности лекарственных препаратов (ЛП) из плазмы крови человека. Риск вирусной контаминации ЛП из плазмы крови человека вероятен в случае использования для их производства плазмы крови донора (человека), в крови которого присутствуют гемотрансмиссивные вирусы.

Меры по обеспечению вирусной безопасности должны включать следующие элементы: обеспечение вирусной безопасности индивидуальных донаций плазмы крови доноров (источника субстанции), обеспечение вирусной безопасности субстанции «Плазма человека для фракционирования» и обеспечение вирусной безопасности в процессе производства ЛП из плазмы крови человека.

Требования, предъявляемые к обеспечению вирусной безопасности ЛП из плазмы крови человека, устанавливаются уполномоченным органом в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов на территории РФ.

Общая фармакопейная статья не распространяется на другие трансмиссивные агенты, такие как возбудители трансмиссивной губчатой энцефалопатии.

Основные требования к организации мер управления риском вирусной контаминации лекарственных средств, к процессам вирусной инактивации и/или элиминации и их валидации приведены в ОФС «Вирусная безопасность».

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Гемотрансмиссивные вирусы – вирусы, которые могут передаваться через кровь, например, вирус иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусы гепатитов В (ВГВ), С (ВГС), D (ВГD), парвовирус В19, вирус лихорадки Западного Нила и многие др.

Маркеры гемотрансмиссивных инфекций − вирусные антигены, антитела к ним или нуклеиновые кислоты вирусов, выявление которых позволяет установить присутствие вируса в крови (плазме крови), а также выявить наличие иммунитета после вакцинации или перенесенного заболевания. К маркерам гемотрансмиссивных инфекций, которые можно обнаружить в крови, относятся: антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 или обнаружение белка р24 ВИЧ-1; поверхностный антиген (HBsAg) ВГВ, а также ДНК этого вируса; антитела к ВГС, РНК вируса гепатита А (ВГА), ДНК парвовируса В19 и др.

Карантинизация индивидуальной донации плазмы крови – хранение индивидуальной порции плазмы крови доноров с запретом ее использования в период хранения до повторного исследования крови донора на возможное обнаружение маркеров гемотрансмиссивных инфекций.

Индивидуальная единица субстанции «Плазма человека для фракционирования» – индивидуальная донация плазмы крови донора, протестированная на содержание маркеров гемотрансмиссивных инфекций, прошедшая процедуру карантинизации перед объединением в минипул.

Минипул − объединенная проба двух и более индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования». Минипул тестируется в должном порядке на выявление маркеров гемотрансмиссивных инфекций. Размер минипула (количество образцов субстанции, объединяемых в минипул) определяется в процессе валидации процедуры «пулирования» (объединения) с использованием определенных тест-систем и диагностических наборов и может быть ограничен чувствительностью используемых тест-систем и диагностических наборов.

Прослеживаемость − совокупность документированных действий персонала, позволяющих проследить все этапы заготовки, контроля (обследования), производства, хранения, транспортирования, применения и утилизации каждой индивидуальной донации плазмы крови донора и каждой индивидуальной единицы субстанции «Плазма человека для фракционирования».

Поскольку источником получения фармацевтической субстанции «Плазма человека для фракционирования» являются донор (человек), риск вирусной контаминации субстанции связан с возможным присутствием в ней гемотрансмиссивных вирусов человека, включая вирусы, неизвестные на сегодняшний день.

Основные гемотрансмиссивные вирусы, которые могут присутствовать в крови донора и контаминировать ЛП из плазмы крови человека в процессе их промышленного получения − вирус иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1, ВИЧ-2), вирусы гепатитов В, С, А, парвовирус В19 и др.

Потенциальными источниками вирусной контаминации также могут быть реактивы, материалы или др. агенты (например, ферменты, выделяемые из экстрактов тканей человека и животных, моноклональные антитела для аффинной хроматографии и др.), используемые в процессе производства ЛП из плазмы крови человека.

Для предотвращения потенциального риска контаминации гемотрансмиссивными вирусами должна быть организована система мер по

обеспечению вирусной безопасности ЛП из плазмы крови человека, включающая нижеперечисленные взаимодополняющие факторы:

I. Обеспечение вирусной безопасности индивидуальных донаций плазмы крови доноров:

- отбор здоровых доноров;

- тестирование индивидуальных донаций крови доноров на содержание маркеров гемотрансмиссивных инфекций;

- организация прослеживаемости индивидуальных донаций плазмы крови доноров;

- карантинизация индивидуальных донаций крови доноров.

II. Обеспечение вирусной безопасности субстанции «Плазма человека для фракционирования» (индивидуальной единицы субстанции, минипула и производственного пула)**:**

- тестирование индивидуальных единиц субстанции на содержание маркеров гемотрансмиссивных инфекций;

- тестирование минипулов индивидуальных единиц субстанции на содержание маркеров гемотрансмиссивных инфекций;

- тестирование производственного пула плазмы (загрузки), полученного из объединенных минипулов индивидуальных единиц субстанции на содержание маркеров гемотрансмиссивных инфекций.

III. Обеспечение вирусной безопасности в процессе производства:

- включение не менее двух эффективных стадий вирусной инактивации и/или элиминации и обязательное проведение процедур их валидации.

Необходимо использовать все факторы обеспечения вирусной безопасности, т.е. сведение риска вирусной контаминации к минимуму, поскольку ни один из данных факторов не дает полной гарантии предотвращения потенциального риска контаминации ЛП из плазмы крови человека гемотрансмиссивными вирусами.

Субстанция «Плазма человека для фракционирования» должна быть получена из крови здоровых доноров, отобранных в соответствии с

требованиями действующих нормативных правовых актов и должна соответствовать ФС «Плазма человека для фракционирования».

Испытание исходных материалов биологического происхождения является обязательным условием минимизации риска вирусной контаминации. Вирусная безопасность должна быть подтверждена комплексно в соответствии с регламентированными алгоритмами тестирования.

В индивидуальной донации плазмы крови донора, индивидуальной единице субстанции «Плазма человека для фракционирования», минипуле и производственном пуле плазмы крови человека обязательно подтверждается отсутствие содержания маркеров следующих вирусов − гепатита В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Кроме того, программа тестирования минипулов и производственного пула дополнительно может включать определение содержания нуклеиновых кислот вируса гепатита А и парвовируса В19.

Уполномоченный орган с учетом эпидемиологической обстановки в регионе сбора субстанции может устанавливать дополнительные требования к процедуре проведения тестирования на маркеры вирусных инфекций (вируса гепатита Е, D, вируса лихорадки Западного Нила и др.).

Отсутствие маркеров гемотрансмиссивных вирусов в исследуемых образцах крови должно быть обязательно подтверждено с использованием сочетания иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования в соответствии с валидированными алгоритмами тестирования.

Тест- системы и наборы реактивов, применяемые для анализа, должны быть предназначены для тестирования образцов крови человека и иметь чувствительность и специфичность, подтвержденную с использованием соответствующих стандартных панелей/референс-препаратов/стандартных образцов, аттестованных в процентах/международных единицах и должна соответствовать регламентированным требованиям.

Вирусная безопасность ЛП, полученных из плазмы крови человека, должна быть подтверждена в разделах: «Поверхностный антиген вируса

гепатита В (HBsAg)», «Антитела к вирусу гепатита С», «Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1». На вторичную (потребительскую) упаковку должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Иммунодиффузия в геле ОФС.1.8.2.0001.15

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±5) °С) 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 испытуемыми образцами в соответствии со схемой (рис. 1) в объеме, не превышающем объем лунки (объем вносимых образцов указывают в нормативной документации).

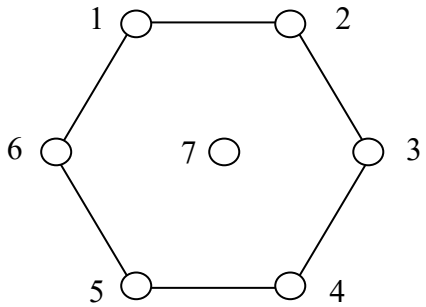


Рисунок 1– Схема нанесения реагентов

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±3)°С в течение 48 ч.

Учет результатов анализа 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).

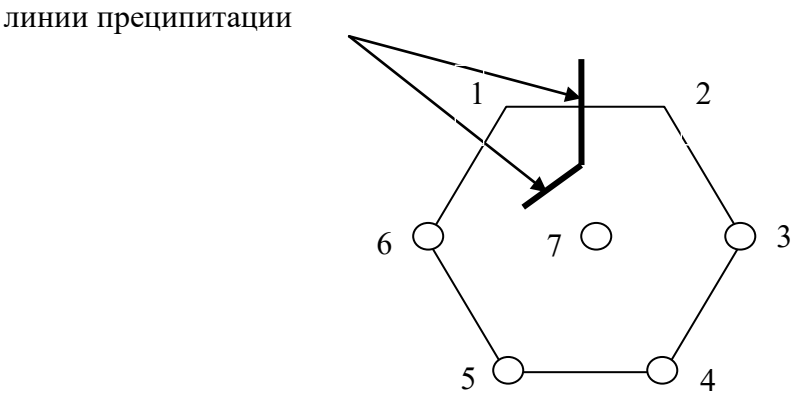


Рисунок 2– Учет полученных результатов при подтверждении видоспецифичности препаратов крови человека

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±3)°С. Допустимо применение агарового геля иного состава в соответствии с указаниями в нормативной документации.

Иммуноэлектрофорез в агаровом геле **ОФС.1.8.2.0002.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для исследования антигенного состава биологических материалов, а также для определения чистоты, качественного и количественного состава биологических лекарственных препаратов (БЛП) 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, 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. В результате, при этих условиях образуются 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 90х120 мм помешают строго горизонтально на предметный столик. Охлажденный до температуры $(45\pm5)^0$С 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 белков сыворотки крови человека (при проведении испытаний фракционного состава) или поливалентную сыворотку против белков сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи (для подтверждения подлинности).

Пластину с агаровым гелем помещают во влажную камеру и выдерживают при температуре $(5\pm3)^0$С 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 при комнатной температуре. За указанный период времени раствор меняют 3-4 раза. Затем пластину извлекают из 0,9% раствора натрия хлорида, 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°С. После высушивания пластины 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 несколько раз в растворе для отмывания 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°С.

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 белков сыворотки 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»). Основной компонент препарата иммуноглобулинов человека должен соответствовать иммуноглобулину 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 белков сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи. Должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Примечания

1. Приготовление 0,05М веронал-мединалового буферного раствора (pH 8,6±0,1). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,38 г веронала, 8,76 г мединала, добавляют воды очищенной до метки и перемешивают до полного растворения.

2. Приготовление 0,05М боратного буферного раствора (pH 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:

a) Для приготовления 1,25% агарового геля используют 0,05М веронал-мединаловый буфер (pH 8,6±0,1) с удвоенной концентрацией солей (соответственно, 2,76 г веронала и 17,52 г мединала на 1000 мл воды очищенной).

b) Для приготовления 1,25% агарового геля используют боратный буферный раствор (pH 8,6±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±1) ^{0}С. 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-мединалового 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:

a) 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.

b) 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 человека	**ОФС.1.8.2.0003.18** **Взамен ОФС.1.8.2.0003.15**

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±0,1. Анализ проводят

при температуре 37°С 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±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±0,5)°С. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору II, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при (37 ± 0,5)°С в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно нагретого до температуры (37±0,5)°С 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 FII (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 (H-D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонилглицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид, H-D-циклогексилглицил-α-аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат) с образованием *п*-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±0,5)°С 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±0,5)°С в течение 2 мин. По истечении времени инкубации в каждую лунку вносят по 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIа.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности (ΔA/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 ΔA/мин как угол наклона прямой. Из значений ΔA/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°С.

Приготовление раствора тромбина

Лиофилизат 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°С. 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°С 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°С 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±0,5)°С. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору VII и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при (37±0,5)°С в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры (37±0,5)°С 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 двухкратно, 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±0,5)°С 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± 0,5)°С 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% (о/о) 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)°С. 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)°С в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры (37 ± 0,5)°С 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 Xa. При избытке фактора X и оптимальных количеств Ca^{2+}, фосфолипидов и фактора IXa скорость активации фактора X линейно зависит от количества фактора VIII. Фактор Xa 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 Xa 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^{o} 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^{o}C, 2 нед при температуре минус 30 ^{o}C и 1 мес при температуре минус 80^{o}C. Не следует хранить при температуре минус 20^{o}C. Перед использованием нагревают до температуры 37^{o}C.

3. Концентрат ×10 трис-буфера. Стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°С. 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 H 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^{o}С;
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^{o}C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37^{o}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^{o}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^{o}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±0,5)°С. 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± 0,5)°С в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры (37 ± 0,5) °С 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±0,5)°С. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору X, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при (37±0,5)°С в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры (37±0,5)°С 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 *n*-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 двухкратно, 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±0,5)°С 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±0,5)°С 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 (ΔA/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 ΔA/мин как угол наклона прямой. Из значений ΔA/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 помошью 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±0,5)°С 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°С 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 АТIII основан на его способности нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. К образцу, содержащему АТIII, добавляют избыточные количества гепарина и тромбина. Образующийся комплекс АТIII-гепарин нейтрализует количество тромбина, пропорциональное количеству АТIII. Оставшийся тромбин селективно расщепляет хромогенный субстрат с образованием *п*-нитроанилина, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, количество АТIII обратно пропорционально величине поглощения свободного *п*-нитроанилина в образце.

Определение активности АТIII проводят с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец АТIII 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 АТIII линейна в интервале активности АТIII от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Используя буфер с гепарином, готовят 4 разведения стандартного образца или плазмы-калибратора с активностью АТIII от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Анализ проводят при температуре 37°С 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 ATIII.

Готовят 2 разведения исследуемого образца с ориентировочной активностью ATIII менее 1,0 МЕ/мл. Определение активности ATIII в испытуемых образцах проводят при температуре 37°С согласно указаниям в инструкции к набору. Активность ATIII в испытуемых разведениях находят по калибровочному графику. Активность ATIII в исследуемом образце определяют как:

$$A = A_x \cdot k ,$$

где: A_x – активность ATIII 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 0,025М раствор кальция хлорида. В качестве разбавителя стандартного и испытуемых образцов используют 0,9% раствор натрия хлорида. Стандартный образец гепарина растворяют в очищенной 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°С. 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)°С. Затем в пробирку вносят 100 мкл предварительно прогретого до температуры 37°С 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 ATIII и FXa происходит ингибирование количества FXa, пропорционального количеству гепарина. Оставшийся FXa отщепляет от специфического хромогенного субстрата *п*-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°С 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°С. 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±0,5)°С в течение 30 с, после чего в лунки добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха и вновь инкубируют при температуре (37 ± 0,5)°С 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% (о/о) 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**

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 0rr.

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 визуально 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±0,5)°С 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 (pH 7,4±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 (pH 7,4±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. Подготовку стандартных образцов проводят в соответствии с инструкцией по применению. Анализ проводят с образцами, разведенными фосфатным буферным раствором (pH 7,4±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 $(37\pm0,5)^0$С в течение 10–15 мин. Раствор используют свежеприготовленным. Возможно хранение раствора при температуре$(6\pm2)^0$С в течение 5 сут или при температуре минус (21±1)°С 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 $(37\pm0,5)$ ^{0}С, 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 бычего сывороточного альбумина.

Аналогичным образом приготавливают 3% суспензию D-отрицательных эритроцитов, полученных от 1–3 доноров.

5. Приготовление фосфатного буферного раствора pH 7,4. 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±0,1 1М раствором натрия гироксида или 1 М раствором хлористоводородной кислоты, перемешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.

Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека **ОФС.1.8.2.0005.15**

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 сенсибилизацию эритроцитов. Добавление антиглобулиновой сыворотки в солевой среде при температуре (37±0,5)°С вызывает агглютинацию сенсибилизированных эритроцитов и позволяет визуализировать результат реакции.

Проведение испытания

Содержание гемагглютининов определяют с использованием эритроцитов человека групп крови A_1 (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) используют 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% суспензию эритроцитов человека группы крови A_1 (II) (первый ряд) и 5% суспензию эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд). Пробы осторожно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при температуре (37±0,5)°С. 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±0,5)°С 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 A_1 (II) (первый ряд) и 0,8% суспензии эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца (ИО). Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°С 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 A_1 (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.

Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ **ОФС.1.8.2.0006.15**

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:

$$Vc = Vo + Vi + Vd,$$

где: Vo – свободный объем подвижной фазы;
Vi – объем пор, заполненный подвижной фазой (объем неподвижной фазы);
Vd – объем матрицы сорбента без учета пор.

Полный объем подвижной фазы колонки (Vt) представляет собой сумму свободного объема подвижной фазы (Vo) и объема неподвижной фазы Vi.

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит в основном от соотношения размеров молекул и пор. Коэффициент распределения (Kd) представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной (C_1) и подвижной фазах (Co): $Kd = C_1/Co$. 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 10 до 600 кДа. 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**

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 сенсибилизированных 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 CH_{50}); затем добавляют сенсибилизированные 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 (о/о).

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 и 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:

$$V_{БР} = (V_Н \cdot A/0,62) – V_Н,$$

где: $V_{БР}$ – добавочный объем буферного раствора, мл;
$V_Н$ – 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 табл.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±0,5°С в течение 30 мин.

По окончании инкубации по 0,2 мл каждой из этих инкубированных проб переносят в новые пробирки, 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±0,5°С в течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре 5±3°С 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):

$$Y_{\%} = \frac{Ап - Ао}{Ак - Ао} \cdot 100\%,$$

где: Ап – среднее значение оптической плотности разведений гемолитической сыворотки;
Ао – среднее значение оптической плотности контрольных проб без гемолиза;
Ак – 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 сенсибилизированных 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 мес.

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 табл. 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±0,5°С в течение 60 мин; затем охлаждают 10 мин при температуре 5±3°С 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):

$$Y = \frac{Ап - Ао}{Ак - Ао},$$

где: Ап – среднее значение оптической плотности испытуемой пробы;
Ао – среднее значение оптической плотности контрольной пробы без гемолиза;
Ак – 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):

$$CH_{50}/мл = \frac{B}{C \cdot 5},$$

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 «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». 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):

$$V = \frac{50 \cdot 0,2}{C} \quad ,$$

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 CH_{50}/мл. Конечный объем проб – 1 мл.

Пробирки инкубируют в термостате при температуре 37±0,5^{0}С 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 табл. 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±0,5°С в течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре 5±3°С 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 аналогично, как указано в разделе «Титрование комплемента».

Если центрифугирование и/или считывание результатов не может быть проведено немедленно, пробы хранят при температуре 5±3˚С не более 1 ч.

Учет и интерпретация результатов

Вычисляют по формуле (4) активность комплемента в гемолитических единицах (CH_{50}/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):

$$АКА = \frac{b-a}{b} \cdot 100\ \%\ ,$$

где: b – активность комплемента (CH_{50}/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).

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина в CH_{50}/мг белка рассчитывают по формуле (7):

$$\text{АКА}(CH_{50}/\text{мг белка}) = \frac{20\ CH50 \cdot (\frac{b-a}{b})}{10},$$

где: 20 CH_{50} – количество комплемента, взятого для испытания;
b – активность комплемента (CH_{50}/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±3°С 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±3˚С 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±3˚С 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±3°С 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 раствора 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±3°С. Стабилизированную кровь барана можно использовать в течение 28 дней, но не ранее чем через 7 дней после взятия.

4. Приготовление цитратного буферного 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°С. Хранят при температуре 5±3°С в течение 1 мес.

5. Приготовление гемолитической системы (суспензии сенсибилизированных 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±0,5°С в

течение 15 мин, после чего хранят при температуре 5±3°С и используют в течение 6 ч.

6. Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от сгустка крови центрифугированием при температуре 4°С. Хранят в небольших количествах при температуре ниже минус 70°С.

7. Приготовление раствора комплемента, содержащего 100 CH_{50}/мл. В зависимости от исходной активности комплемента 1 мл раствора комплемента разбавляют буферным раствором до содержания 100 CH_{50}/мл.

Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных **ОФС.1.8.2.0008.15**

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 (pH 7,2 ± 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°С.

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 8^0С.

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 отмытых 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±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:

$$V_{доб} = V_{нач} \cdot A_{400} / 0,53 - V_{нач},$$

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 отмытые эритроциты в объеме ($V_{эр.доб}$), рассчитанном по формуле:

$$V_{эр.доб} = V_{эр.исх} \cdot 0,53 / A_{400} - V_{эр.исх},$$

где: $V_{эр.исх}$ – 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 антиальфастафилолизина, 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 стафилотоксина

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 антиальфастафилолизина разводят до содержания 1 МЕ

антиальфастафилолизина 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 антиальфастафилолизина) осторожно встряхивают и инкубируют при температуре от 18 до 22°С 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±0,5)°С 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 антиальфастафилолизина 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 антиальфастафилолизина в 1 мл

испытуемого 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 антиальфастафилолизина в 1 мл. Далее из этого

разведения, содержащего 1 МЕ/мл, готовят следующие разведения по схеме (табл.2).

Таблица 2 – Схема разведения СО антиальфастафилолизина

№ пробирки	Концентрация СО антиальфастафилолизина, 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 антиальфастафилолизина (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 ^{0}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 2-8^{0}С. 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 МЕ·100=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:

$$К = а/0,1,$$

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±0,05.

Методика определения содержания антиальфастафилолизина в испытуемых 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°С 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)°С 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 МЕ	Годен
2	++++	++	−	0,125 МЕ	Возможно годен
3	+++	+ (−)	−	> 0,125< 0,25 МЕ	Не годен
4	++	−	−	0,25 МЕ	Не годен
5	+ (−)	−	−	> 0,25 МЕ	Не годен
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**

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, pH, 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, α1-глобулины, α2-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 α1-, α2- и β-глобулины.

Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы

На увлажнённую плёнку из ацетата целлюлозы размером 90х90 мм, заправленную в специальную рамку (трафарет), наносят 2-4 мкл исследуемых образцов (5 образцов в 2-х параллельных определениях) и для идентификации контрольный образец – сыворотку 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 (pH 8,4). Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой подходящий коммерческий буферный раствор с указанным значением pH.

Рамку с пленкой из ацетата целлюлозы помещают в разделительную камеру прибора для электрофореза, 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 отмывки кювету покачивают). После отмывки 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 в следующей последовательности от линии старта: альбумин, α1- и α2-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 ($h \cdot d$, 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.

Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных **ОФС.1.8.2.0010.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод количественного определения белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека (иммуноглобулинах, альбумине) и животных (антитоксических сыворотках) (Метод А) и на методику количественного определения белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови животных (гетерологичные иммуноглобулины и антитоксические сыворотки), разведенных в 100 раз (Метод Б).

Методы основаны на взаимодействии в щелочной среде пептидных связей молекул белков с ионами двухвалентной меди (Cu^{2+}) с образованием биуретового комплекса, окрашенного в фиолетовый цвет, интенсивность которого, измеряемая при длине волны 540 нм, прямо пропорциональна содержанию белка в препарате.

Колориметрический метод с биуретовым реактивом обладает низкой чувствительностью к посторонним веществам, которые могут присутствовать в качестве примеси в препарате.

Метод А (содержание белка от 5 до 20 %)

К 5 мл испытуемого раствора, приготовленного из испытуемого образца с содержанием белка от 2 до 4 мг/мл, прибавляют 5 мл биуретового реактива для

препаратов крови человека и животных, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. При тех же условиях аналогичным образом готовят стандартный раствор (СО). Испытуемые и стандартные растворы готовят в двух повторностях. Одновременно готовят контрольный раствор, используемый в качестве раствора сравнения, содержащий 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 5 мл биуретового реактива. Измеряют оптическую плотность окрашенных растворов при длине волны 540 нм (если нет других указаний в нормативной документации) в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Содержание белка (X) в препарате в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot Co}{Ao},$$

где:

A – значение оптической плотности раствора испытуемого образца;

Ao – значение оптической плотности СО;

Co – содержание белка в СО, в процентах.

Примечания

1. Испытуемый раствор (*A*). 1 или 2 мл испытуемого образца (в зависимости от исходного содержания белка) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,9 % раствором натрия хлорида до метки и перемешивают. Содержание белка в испытуемом растворе от 2 до 4 мг/мл.

1. Стандартный раствор (СО). Для препаратов иммуноглобулинов, альбумина и антитоксических сывороток используют соответствующие стандартные образцы, разрешенные к применению уполномоченными органами в соответствии с инструкциями по применению. Допускается использование стандартных образцов предприятия, аттестованных с использованием вышеуказанных стандартных образцов.

2. Биуретовый реактив для препаратов крови человека и животных. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 45 г калия-натрия тартрата, растворяют в 200 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида, прибавляют 5 г меди (II) сульфата, затем прибавляют 5 г калия иодида и доводят объем тем же раствором натрия гидроксида до метки и перемешивают.

Метод Б (содержание белка от 0,08 до 0,13 %)

К 5 мл раствора испытуемого образца с содержанием белка в препарате от 0,8 до 1,3 мг/мл прибавляют 5 мл биуретового реактива для препаратов крови человека и животных, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Аналогичным образом готовят разведенный 1: 100 стандартный образец (СО). Одновременно готовят контрольный раствор (см. приготовление по методу А). Испытуемые и стандартные образцы готовят в двух повторностях. Далее анализ проводят по методу А.

Содержание белка (Х) в разведенном препарате 1:100 в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D\text{исп.} \cdot \text{Ссо}}{D\ \text{со}},$$

где:

D исп. – значение оптической плотности испытуемого образца, разведенного 1:100;

D со – значение оптической плотности СО, разведенного 1:100;

Ссо – содержание белка в СО, в процентах.

Примечания

1. Разведенный стандартный образец. Используют соответствующие стандартные образцы (иммуноглобулина или антитоксической сыворотки), разрешенные к применению уполномоченными органами в соответствии с инструкциями по применению.1 мл стандартного образца с содержанием белка от 80 до 160 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора 0,9 % раствором натрия хлорида до метки и перемешивают. Допускается использование стандартных образцов предприятия, аттестованных с использованием вышеуказанных стандартных образцов.
2. Буретовый реактив для препаратов крови человека и животных. (см. Примечания № 3 Метод А).

Количественное определение мальтозы методом Хагедорна-Йенсена в препаратах из плазмы крови человека **ОФС.1.8.2.0011.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения мальтозы в лекарственных препаратах из крови, плазмы крови человека методом Хагедорна-Йенсена.

Метод основан на способности мальтозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) восстанавливать в щелочной среде железо красной кровяной соли $K_3[Fe(CN)_6]$ (гексацианоферрат (III) калия), превращая ее в желтую кровяную соль $K_4[Fe(CN)_6]$ (гексацианоферрат (II) калия). Гексацианоферрат (III) калия реагирует с калия иодидом с выделением свободного йода, определяемого титрованием раствором натрия тиосульфата с использованием раствора крахмала в качестве индикатора.

Методика определения

Восстановление гексацианоферрата (III) калия в щелочной среде в гексацианоферрат (II) калия происходит по следующей схеме реакций:

2K3[Fe(CN)6] + 2KI = 2K4[Fe(CN)6] + I2↑

$K_3[Fe(CN)_6] \xrightarrow{C_{12}H_{22}O_{11}} K_4[Fe(CN)_6]$

I2 + 2Na2S2O3 = 2NaI + Na2S4O 6

В 4 стеклянные пробирки вносят по 5 мл 0,45 % раствора цинка сульфата, 1мл 0,1М раствора натрия гидроксида, добавляют в 2 пробирки по 0,1 мл испытуемого образца, в 1 пробирку 0,1 мл воды очищенной (контрольная проба), в 1 пробирку 0,1 мл 10 % раствора мальтозы (раствор сравнения). Все пробирки помещают в кипящую водяную баню на 3 мин для осаждения белков. Пробирки охлаждают, содержимое фильтруют через бумажный фильтр. К 1 мл фильтрата добавляют 5 мл 5 % раствора красной кровяной соли и помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. Пробы охлаждают до комнатной температуры, вносят 3 мл 10 % раствора калия иодида, 2 мл 3 % раствора уксусной кислоты и перемешивают. Содержимое пробирок переносят в плоскодонные конические колбы вместимостью 100 мл, добавляют 0,1 мл 1 % раствора крахмала в насыщенном растворе натрия хлорида и через 15 мин титруют 0,005 М раствором натрия тиосульфата до исчезновения темной окраски.

Определяют объем 0,005М раствора натрия тиосульфата, пошедший на титрование контрольной пробы испытуемых образцов и 10 % раствора мальтозы. Объем, пошедший на титрование 0,005М раствора тиосульфата натрия, обратно пропорционален содержимому мальтозы в испытуемых образцах. Содержание мальтозы (С) в испытуемом образце в процентах (%) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{Vк - Von}{Vк - Vpc} \cdot 10$$

где:

Vк – объем раствора натрия тиосульфата, пошедший на титрование контрольной пробы, мл;

Vpc – объем раствора натрия тиосульфата, пошедший на титрование раствора сравнения, мл;

Vоп – объем раствора натрия тиосульфата, пошедший на титрование опытной пробы; мл;

10 – коэффициент пересчета содержания мальтозы в растворе сравнения, в %.

Примечания

1. Приготовление 0,45 % раствора цинка сульфата. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 4,5 г цинка сульфата 7-водного, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 10 сут.
2. Приготовление 0,1 Н раствора натрия гидроксида из фиксанала.
Раствор готовят в соответствии с инструкцией по приготовлению фиксанала.
3. Приготовление 5 % раствора гексацианоферрата (III) калия. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 5,0 г гексацианоферрата (III) калия, 5,0 г натрия карбоната, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 2 мес.
4. Приготовление 10 % раствора калия иодида. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 10 г калия иодида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.
5. Приготовление 3 % раствора уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят небольшое количество воды очищенной, 3,0 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.
6. Приготовление насыщенного раствора натрия хлорида. 36 г натрия хлорида растворяют в 64 мл воды очищенной при температуре 20 ºС при периодическом встряхивании. Перед использованием раствор декантируют и, при необходимости, отфильтровывают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.7. Приготовление 1 % раствора крахмала в насыщенном растворе хлорида натрия. 1 г крахмала растворяют в 100 мл кипящего насыщенного раствора натрия хлорида. При необходимости раствор отфильтровывают через вату. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 ° С в течение 4 мес.
8. Приготовление 0,005М раствора натрия тиосульфата.
Приготовление 0,1 Н раствора натрия тиосульфата из фиксанала. Раствор готовят в соответствии с инструкцией по приготовлению фиксанала.
Затем 12,5 мл 0,1 Н раствора натрия тиосульфата переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.
9. Приготовление 10 % раствора мальтозы (раствора сравнения). 10,00 г (точная навеска) мальтозы, предварительно высушенной до постоянной массы, растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор мальтозы используют свежеприготовленным или стерилизуют для хранения пропусканием через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм), либо разливают во флаконы и прогревают 10 ч при температуре 60 °С. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 года.

Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека **ОФС.1.8.2.0012.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека методами: кинетической нефелометрии, иммуноферментного анализа и радиальной иммунодиффузии. Испытание проводят любым из приведенных методов. В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на основании результатов, полученных при проведении испытания методом кинетической нефелометрии.

Метод А. Метод кинетической нефелометрии

Метод кинетической нефелометрии основан на измерении скорости увеличения светорассеяния реакционного раствора, содержащего латексные частицы с комплексами антиген-антитело.

Для определения содержания иммуноглобулинов классов G, M и A используют наборы реагентов, содержащие латексные частицы с иммобилизованными антителами к иммуноглобулинам соответствующего класса. Для оценки качества препаратов иммуноглобулина человека нормального [IgG+IgM+IgA] содержание иммуноглобулинов классов M и A определяют с использованием наборов с высоким аналитическим диапазоном; для оценки остаточного содержания иммуноглобулинов M и A в иных препаратах иммуноглобулина человека – наборы с низким аналитическим диапазоном. Оценку количественного содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в пре-

паратах иммуноглобулина человека проводят с помощью автоматизированных аналитических систем, имеющих калибровочную систему и соответствующие статистические программы расчета. Валидационные исследования проводят с учетом явлений интерференции, указанных производителем конкретного набора реагентов, а также зависящих от наличия в препаратах иммуноглобулина вспомогательных веществ.

Подготовку наборов реагентов осуществляют в соответствии с инструкцией производителя. Обязательно одновременное использование стандартного образца (СО) количественного содержания иммуноглобулинов классов G, A, M.

Критерии приемлемости результатов:

– содержание иммуноглобулинов классов G, A, M должно соответствовать аттестованным величинам

– содержание иммуноглобулинов классов G, A, M в СО должно соответствовать аттестованным величинам.

Примечания

Подготовка испытуемого образца. При необходимости готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в фармакопейной статье и/или нормативной документации производителя).

Подготовка стандартного образца. Подготовку стандартного образца осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению.

Метод В. Метод иммуноферментного анализа

Используют один из вариантов иммуноферментного анализа (ИФА) - «сэндвич», основанный на специфическом взаимодействии антигена с антителом с образованием иммунного комплекса и последующей детекции полученного комплекса с помощью метода спектрофотометрии. Оценку количественного содержания иммуноглобулинов классов G, M и A проводят по измерению интенсивности окраски реакционной смеси, зависящей от количества выделившегося хромофора, которая прямо пропорциональна содержанию иммуноглобулинов в исследуемом образце; выявляется измерением

интенсивности окраски. Содержание иммуноглобулинов вычисляют в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов.

Для определения содержания иммуноглобулинов классов G, M и A используют коммерческие наборы реагентов в соответствии с инструкцией производителя. Допустимо применение иных иммуноферментных систем, указанных в нормативной документации.

Методику проведения иммуноферментного анализа и используемые контрольные сыворотки (контроли) указывают в нормативной документации, их применимость подтверждают валидационными исследованиями.

Для подтверждения правильности методики обязательно использование СО при каждом определении.

Критерии приемлемости результатов:

– содержание иммуноглобулинов классов G, A, M в контролях входящих в состав набора реагентов, должно соответствовать аттестованным величинам.

– содержание иммуноглобулинов классов G, A, M в СО должно соответствовать аттестованным величинам.

Примечания

Подготовка испытуемого образца. При необходимости готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в фармакопейной статье и/или нормативной документации производителя. Методику разведения испытуемого препарата обосновывают с учетом данных по валидации на основании предполагаемого содержания иммуноглобулинов соответствующего класса и выбранного диапазона значений калибровочной кривой.

Подготовка стандартного образца. Подготовку стандартного образца осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению.

Метод С. Метод радиальной иммунодиффузии

Метод радиальной иммунодиффузии основан на специфическом взаимодействии антител к соответствующему классу иммуноглобулинов, находящихся в растворе агара и иммуноглобулинов классов G, A и M, которые при нанесении в лунки радиально взаимодействуют с антителами и форми-

руют кольцо преципитации. Диаметр кольца преципитации зависит от количества иммуноглобулина. Содержание иммуноглобулинов вычисляют путем сравнения со стандартным образцом, аттестованным по содержанию иммуноглобулинов классов G, A и M в мг/мл.

Используют наборы реагентов, содержащие антисыворотки к иммуноглобулинам классов G, A и M, в соответствии с инструкцией производителя. Возможно применение планшета с нанесенным агаровым покрытием, содержащим необходимое количество соответствующей антисыворотки.

Примечания

Подготовка испытуемого образца. При необходимости готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в фармакопейной статье и/или в нормативной документации производителя). Необходимость разведения испытуемого препарата обосновывают с учетом данных по валидации методики на основании предполагаемого содержания иммуноглобулинов соответствующего класса и выбранного диапазона значений калибровочной кривой. Например, для оценки содержания иммуноглобулинов классов A и M препараты иммуноглобулина человека нормального [IgG+IgM+IgA] разводят соответствующим растворителем, указанным в фармакопейной статье и/или в нормативной документации 1:10, иные препараты иммуноглобулинов человека используют без разведения. Для оценки содержания иммуноглобулинов класса G препараты иммуноглобулина человека нормального [IgG+IgM+IgA] разводят 1:10, для иных препаратов иммуноглобулинов человека готовят ряд двукратных разведений с использованием 0,9 % раствора натрия хлорида: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 (при содержании белка не более 50 мг/мл) или 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 (при содержании белка более 50 мг/мл).

Подготовка стандартного образца. Подготовку стандартного образца осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению. Готовят ряд двукратных разведений стандартного образца с использованием 0,9 % раствора натрия хлорида. Диапазон значений калибровочной кривой должен находиться в интервале, соответствующем ожидаемому содержанию иммуноглобулинов в испытуемом образце (например, неразведенный стандартный образец, разведения 1:2, 1:4, 1:8).

Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека	**ОФС** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на метод определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах альбумина человека и иммуноглобулинов человека для внутривенного ведения.

Метод определения содержания активатора прекалликреина основан на превращении прекалликреина в калликреин в присутствии активатора прекалликреина (АПК), образовавшийся калликреин способен отщеплять хромофор от синтетического хромогенного субстрата, количество которого прямо пропорционально содержанию АПК в образце. Образующийся хромофор определяют спектрофотометрическим методом.

Содержание АПК вычисляют путем сравнения со стандартным образцом (СО), калиброванным в международных единицах (МЕ). За международную единицу (МЕ) принята активность установленного количества международного СО. Эквивалентность международного СО в МЕ устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Оценка количественного содержания активатора прекалликреина в образце препарата крови может осуществляться двумя способами:

- по измерению скорости образования хромофора в реакционной смеси (скорости изменения окраски в минуту) - кинетический тест, Способ А;

- по измерению интенсивности окраски реакционной смеси после остановки реакции через оптимальный промежуток времени - тест по конечной точке, Способ В.

Допустимый предел содержания АПК для инфузионных лекарственных препаратов из плазмы крови человека составляет не более 35 МЕ/мл.

Кинетический тест (Способ А)

В лунки 96-ти луночного планшета с плоским дном вносят испытуемый образец и соответствующие разведения СО в трех повторностях. В лунки двух повторностей вносят раствор прекалликреина в соотношении не менее 9:1 от общего объема смеси, в лунку третьей повторности (холостая проба) - буферный раствор в количестве, равном объёму раствора прекалликреина. Содержимое перемешивают и выдерживают при температуре 37±1 ºС в течение необходимого времени в соответствии с указаниями в нормативной документации. По окончании инкубации в лунки всех повторностей вносят рабочий раствор хромогенного субстрата, подогретый до температуры 37±1 ºС, в количестве, не менее чем равном объему смеси образца с раствором прекалликреином в соответствии с указаниями в нормативной документации. Содержимое перемешивают, планшет устанавливают в анализатор/спектрофотометр и при температуре 37±1 ºС регистрируют скорость изменения оптической плотности в мин (ΔА/мин) в течение со 2-й по 10 мин при длине волны 405 нм.

Тест по конечной точке (Способ В)

В лунки 96-ти луночного планшета с плоским дном вносят испытуемый образец и соответствующие разведения СО в трех повторностях. В лунки двух повторностей вносят раствор прекалликреина в соотношении не менее 9:1 от общего объема смеси, в лунку третьей повторности (холостая проба) - буферный раствор в количестве, равном объёму раствора прекалликреина. Содержимое перемешивают и выдерживают при температуре 37±1 ºС в течение необходимого времени в соответствии с указаниями в нормативной документации. По окончании инкубации в лунки всех повторностей вносят

рабочий раствор хромогенного субстрата, подогретый до температуры 37±1 ºС, в количестве, не менее чем равном объему смеси образца с раствором прекалликреином в соответствии с указаниями в нормативной документации. Содержимое перемешивают и выдерживают при температуре 37±1 ºС в течение необходимого времени в соответствии с указаниями в нормативной документации. По окончании инкубации в лунки всех повторностей вносят стоп-реагент в соответствии с указаниями в нормативной документации, перемешивают и регистрируют оптическую плотность при длине волны 405 нм.

Для расчета активности АПК из значений двух повторов изменения оптической плотности в минуту в кинетическом тесте или значений оптической плотности в тесте по конечной точке вычитают соответствующие значения, полученные в холостых пробах. Вычисляют среднее значение изменения оптической плотности или оптической плотности для каждого образца. По результатам средних значений для разведений СО строят линейную калибровочную зависимость изменений оптической плотности или оптической плотности от концентрации СО, по которой вычисляют активность АПК в испытуемом образце.

Допустимо применение готовых наборов реагентов, содержащих все компоненты для хромогенного теста кинетического/по конечной точке в соответствии с фармакопейной методикой. При использовании набора должна быть проведена верификация фармакопейной методики.

Примечания

1. Приготовление буферного раствора 6,055 г трис(гидроксиметил) аминометана и 8,77 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде очищенной, доводят pH до 7,95-8,05 2 М раствором хлористоводородной кислоты, перемешивают, доводят объем раствора водой очищенной до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 ºС не более 6 мес.

2. Приготовление раствора прекалликреина. Может быть применен как раствор прекалликреина, изготовленный в лабораторных условиях из плазмы крови доноров, так и раствор прекалликреина, приготовленный из готового реагента прекалликреина.

2.1.Приготовление раствора прекалликреина из плазмы крови доноров.

Приготовление буфера А.

6,055 г трис(гидроксиметил) аминометана, 1,17 г натрия хлорида, 50 мг гексадиметрин бромида и 10 мг натрия азида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде очищенной, доводят pH до 7,95-8,05 2 М раствором кислоты хлористоводородной, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 ºС не более 6 мес.

Аликвоту плазмы крови доноров диализуют против 10 объемов буфера А в течение 20 час. Отдиализованную плазму наносят на колонку ДЭАЭ-агарозы, уравновешенную буфером А, объем которой в 2 раза превышает объем плазмы. Проводят элюцию буфером А со скоростью 20 мл/см^2/час. Собирают фракции первого пика, поглощающие при 280 нм. Полученный пул контролируют на отсутствие активности калликреина: аликвоту пула смешивают с предварительно подогретым рабочим раствором хромогенного субстрата в соотношении 1:20, инкубируют при 37 ºС в течение 2 мин и определяют изменение оптической плотности в минуту (ΔА/мин) при длине волны 405 нм. Полученный пул прекалликреина пригоден, если ΔА/мин не превышает 0,001. К собранной фракции добавляют натрия хлорид из расчета 7 г/л, фильтруют через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм, разделяют на аликвоты и хранят при температуре ниже минус 25 ºС в течение 12 мес. Аликвоту после размораживания используют в течение рабочего дня.

2.2. Приготовление раствора прекалликреина из готового реагента прекалликреина проводят в соответствии с указаниями в инструкции по применению реагента, если иное не указано в нормативной документации.

3. Приготовление рабочего раствора синтетического хромогенного субстрата. 25 мг хромогенного субстрата (например, S-2302, H-D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина-р-нитроанилин дигидрохлорид) растворяют в буферном растворе до получения раствора с необходимой концентрацией в соответствии с указаниями в нормативной документации.

4. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый препарат иммуноглобулина человека разводят буферным раствором до содержания белка 30 г/л. Необходимость разведения испытуемого препарата альбумина человека указывают в нормативной документации с учетом данных по валидации методики на основании предполагаемого содержания АПК и выбранного диапазона значений калибровочной кривой.

5. Подготовка СО. Подготовку СО осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к СО. Готовят ряд разведений СО с использованием буферного раствора. Разведения и кратность их приготовления выбирают таким образом, чтобы зависимость регистрируемой скорости реакции (или оптической плотности) от концентрации АПК имела линейный характер.

Генотерапевтические лекарственные препараты	**ОФС.1.9.1.0001.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП), относящиеся к биологическим лекарственным препаратам (БЛП).

Генотерапевтические лекарственные препараты − лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности. ГенЛП, полученные с помощью ряда биотехнологических процессов, предназначены для доставки терапевтического гена, производимого *in vivo* или *ex vivo*, в клетки человека или животных с последующей экспрессией *in vivo*. Нуклеиновая кислота в ГенЛП используется для модификации генетического материала клетки в соответствии с системой доставки. Перенос гена, представляющего собой участок ДНК, осуществляется носителем - вектором вирусного или невирусного происхождения, который может быть включен в клетку человека или животного.

Принцип действия генотерапевтических препаратов заключается в доставке нового генетического материала в клетки-мишени с помощью вектора - системы, переносящей генетический материал. Для переноса генов используются два основных типа векторов:

- бактериальная плазмидная ДНК − природная или синтезированные нуклеиновые кислоты или они связаны с носителем или адъювантом, или в

комплексе с другими молекулами (липидами или биополимерами);

- вирусные векторы − вирусы, как правило, не способные к репликации, например, аденовирусы, ретровирусы, вирусы простого герпеса.

Оба типа векторов создают при помощи генетической инженерии с целью экспрессии определенного белка в клетке-мишени.

После переноса векторами генетического материала, он может находиться в цитоплазме, или встраиваться в ядро клетки-реципиента в зависимости от способности ДНК вектора интегрировать в геном клетки-хозяина. В результате происходит генетическая модификация клеток-мишеней для экспрессии требуемого продукта. С учетом специфических свойств конкретного генотерапевтического лекарственного средства и технологии его производства требования, приведенные в настоящей общей фармакопейной статье, могут быть дополнены или изменены в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации. Необходимость замены или использования дополнительных требований для конкретного лекарственного средства должна быть обоснована.

Данная общая фармакопейная статья не распространяется на ДНК-вакцины, препараты клеточной терапии и лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Биологическая фармацевтическая субстанция – фармацевтическая субстанция, произведенная с использованием биологического источника, которая является основой для получения ГенЛП. должна быть охарактеризована с использованием физических, химических и биологических испытаний, качество, которой определяется этими испытаниями в сочетании с контролем процессов ее производства;

Ген– последовательность ДНК, кодирующая один или несколько белков.

Вектор– агент трансмиссии (молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК), переносящий генетическую информацию из одной клетки в другую.

Плазмидный вектор – бактериальная плазмида, используемая для

переноса гена или генов чужеродной ДНК в клетку хозяина (бактерию) и обеспечивающая размножение чужеродных генов в этих клетках.

Вирусный вектор – вектор, произведенный путем модификации вируса с помощью методов молекулярной биологии для удаления определенных и удерживания некоторых, но не всех, материнских генов вируса. При удалении генов, ответственных за способность вируса к репликации, созданный вектор является неспособным к репликации;

Плазмида– часть ДНК, обычно существующая в бактериальной клетке в виде кольцевой структуры, отделенной от клеточной хромосомы. Плазмида может быть модифицирована с помощью методов молекулярной биологии, выделена из бактериальной клетки и использована для переноса и встраивания ее ДНК в геном другой клетки;

Экспрессирующая конструкция – вектор, который содержит кодирующую последовательность рекомбинантного белка и элементы, необходимые для его экспрессии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ

Производство ГенЛП отличается сложностью и многообразием технологических процессов, т.к. связано с биологическими процессами и материалами, такими, как культивирование клеток или экстракция материала из живых организмов. Биологические процессы характеризуются вариабельностью, что приводит к непостоянству спектра и природы сопутствующих продуктов.

Технология получения ГенЛП является новой, требующей дальнейшего совершенствования с учетом специфических особенностей каждого препарата. В связи с этим, к контролю данных препаратов следует применять гибкий подход в зависимости от опыта производства и использования препарата, а также с учетом новых разработок. Все этапы производства фармацевтической субстанции и готового ГенЛП должны быть полностью валидированы. Необходимо обязательное проведение процедур, обеспечивающих постоянство условий производства и характеристик готового препарата. Должны быть

созданы и тщательно охарактеризованы главный (ГБК) и рабочий (РБК) банки клеток, в отношении которых должен проводиться регулярный контроль качества. Все процессы производства, использующие клеточные культуры, должны быть валидированы на предмет отсутствия чужеродных вирусов.

Производство вирусных векторов основано на системах банка культур эукариотических клеток и вирусного посевного материала. Вирусные векторы характеризуются с помощью пригодных валидированных методик. Генетическая стабильность вектора определяется допустимым количеством пассажей и оценивается соответствующими методиками.

Производство плазмидных векторов основано на системе банка бактериальных клеток.

Технология производства ГенЛП должна гарантировать обеспечение получения вектора требуемого качества, а также клеток-продуцентов для культивирования вектора.

Исходные вещества, используемые в производстве ГенЛП подлежат контролю (если применимо). Проводятся испытания: подлинности, специфической активности (если применимо), чистоты и безопасности в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», ОФС «Бактериальные эндотоксины». Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы в объеме и соответствовать требованиям безопасности согласно ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов». При оценке рисков контаминации исходного сырья и исходных материалов особое внимание уделяется риску, связанному с контаминацией возбудителями губчатой энцефалопатии животных (ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств») и латентными вирусами (ОФС «Вирусная безопасность»). Необходимо проводить регулярный контроль исходных материалов, непосредственно контактирующих с технологическим оборудованием или веществами, участвующими в производственном процессе.

ИСПЫТАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Субстанция представляет собой несколько объединенных очищенных биомасс с возможным добавлением стабилизатора, например, декстрозы и других вспомогательных веществ. По завершении смешивания всех составляющих, субстанция должна быть подвергнута стерилизующей фильтрации. В случае возможных нативных изменений активного вещества и компонентов, входящих в состав субстанции, повторная стерилизующая фильтрация не проводится.

Для предотвращения нежелательного изменения первоначальных свойств, которое может произойти вследствие многократных пересевов или большого числа генераций (пассажей бактериальных клеток, вирусов или клеточных культур), производство биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, получаемых из бактериальных культур или размножением вирусов в культурах клеток, эмбрионах птиц, тканях и органах животных, должно быть основано на системе главной и рабочей посевных культур и (или) банков клеток (ГБК и РБК). Данная система может быть неприменимой к некоторым типам высокотехнологичных лекарственных препаратов. Количество генераций (удвоений, пассажей) между посевной культурой или банком клеток и биологической фармацевтической субстанцией, либо лекарственным препаратом должно соответствовать требованиям спецификаций в регистрационном досье или протоколе клинических исследований. Посевные культуры и банки клеток необходимо создавать, хранить и использовать таким образом, чтобы риск их контаминации или изменения был сведен к минимуму (например, хранение в герметичных контейнерах в жидком азоте). Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы и приведены в соответствие с требованиями микробиологической и вирусной безопасности, указанными в ОФС «Требования к клеточным культурам субстратам производства биологических лекарственных препаратов».

Субстанции, используемые при получении лекарственных препаратов,

выпускаемые на разных производствах, должны быть зарегистрированы в установленном порядке.

Качество фармацевтической субстанции и методы ее испытаний оцениваются по приведенным ниже показателям.

Описание. Субстанция должна соответствовать требованиям, указанным в нормативной документации.

Подлинность. Подлинность определяется с помощью комплекса методов, позволяющих специфически идентифицировать действующее вещество, произведенное или выделенное из биологического источника. Для подтверждения подлинности могут быть использованы следующие методы испытания: спектрофотометрический, метод секвенирования кодирующего участка и другие валидированные методы с доказанной специфичностью. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Прозрачность раствора. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность раствора. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Субстанция должна выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси. Данное испытание проводится в случае возможной деструкции активного вещества, произведенного или выделенного из биологического источника в процессе производства, или появления технологических примесей. Требования к чистоте, родственным соединениям и посторонним примесям должны обеспечивать безопасность и эффективность субстанции. Чистота субстанции должна быть определена с помощью ионообменной ВЭЖХ. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»

(ионообменная хроматография) или другими подходящими валидированными методами.

Стерильность. Должна быть стерильна**.** Данное испытание вводят для субстанций, используемых в производстве готовых стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются процедуре повторной стерилизации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должна быть апирогенна или выдерживать требования по содержанию бактериальных эндотоксинов. Данные испытания проводят для субстанций, предназначенных для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Субстанции должны выдерживать тест на пирогенность или бактериальные эндотоксины без проведения повторной стерилизации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины».

В случае если, субстанция не обладает пирогенными свойствами и в процессе производства не может быть загрязнена пирогенными примесями не бактериальной природы, целесообразно проводить испытание на бактериальные эндотоксины.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Данное испытание обязательно для фармацевтической субстанции, произведенной для реализации с целью введения в государственный реестр лекарственных средств РФ.

Вирусная безопасность. ГенЛП, полученные из крови, плазмы крови, органов и тканей человека не должны содержать поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусам гепатитов В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Химические показатели (если применимо). Указывают требования к количественному содержанию белка, нуклеиновых кислот, полисахаридов и др. и метод их определения. При определении действующего вещества субстанции

используют подходящие валидированные методы анализа.

Вещества, вносимые в субстанцию. Проводят количественное определение содержания веществ, используемых в качестве сорбента, адъюванта, консерванта, стабилизатора и др. Каждый показатель указывают в самостоятельном разделе.

Для фармацевтической субстанции, произведенной для реализации с целью введения в государственный реестр лекарственных средств РФ, данное испытание обязательно.

Специфическая активность. Должно быть предусмотрено определение специфической активности соответствующими валидированными методиками с использованием стандартных образцов. Методики должны быть приведены в фармакопейной статье или нормативной документации на субстанцию.

Транспортирование и хранение (где применимо). В герметичном контейнере при температуре, указанной в нормативной документации. Для замороженного раствора недопустимо повторное замораживание и оттаивание.

ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Описание. Приводится описание свойств ГенЛП для конкретной лекарственной формы.

Подлинность. Подтверждают различными методами биологического, микробиологического, иммунобиологического, молекулярного, химического или физико-химического анализа, позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат.

Прозрачность раствора. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность раствора. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Однородность массы дозированных лекарственных форм (для лиофилизатов). Указывается допустимый интервал средней массы и отклонение от средней массы. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Однородность

массы дозированных лекарственных форм».

pH. Приводится допустимый интервал значений pH. Препарат должен выдерживать требования, определенные в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Время растворения. Должно быть приведено время полного растворения ГенЛП с указанием объема применяемого растворителя.

Потеря в массе при высушивании. Указываются нормативные требования в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» методом, предназначенным для биологических лекарственных препаратов.

Чистота. Родственные соединения, посторонние примеси. Указываются нормативные требования к содержанию родственных примесей и метод анализа (например, метод ионообменной хроматографии ДНК, основанный на адсорбции молекул ДНК на неподвижной фазе) с подробным описанием методики.

Специфическая активность. Испытание проводят с помощью методов количественного определения содержания активного вещества, которое произведено или выделено из биологического источника в соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты». Выбор метода определения специфической активности *in vitro* и/или *in vivo* зависит от вида ГенЛП; предпочтительны те валидированные методы, которые с наибольшей достоверностью характеризуют эффективность лекарственного препарата при его практическом применении. Определение специфической активности должно осуществляться с использованием соответствующих стандартных образцов, откалиброванных по отношению к Международным стандартным

образцам (при их наличии).

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Препарат должен быть апирогенным или соответствовать требованиям по бактериальным эндотоксинам, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания для препаратов, предназначенных для парентерального введения, проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» или ОФС «Бактериальные эндотоксины». Для ГенЛП, которые обладают пирогенными свойствами и в процессе производства не могут быть загрязнены пирогенными примесями небактериальной природы, следует проводить испытание на бактериальные эндотоксины.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным**.** Предварительно, тест-дозу разводят 0,9 % раствором натрия хлорида и вводят внутримышечно каждому испытуемому животному, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Неорганический фосфор (для ГенЛП, содержащих бактериальную плазмидную ДНК). В нормативной документации указывают допустимое содержание неорганического фосфора в процентах. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора».

Декстроза в растворе (для ГенЛП содержащих бактериальную плазмидную ДНК). В нормативной документации указывают допустимое содержание декстрозы в растворе испытуемого образца. Определение проводят поляриметрическим методом в соответствии с ОФС «Поляриметрия» с использованием удельного угла вращения декстрозы (глюкозы) $[a]_{D20} = 52,5^{o}$.

Однородность дозирования. В нормативной документации указывают содержание основного вещества. Определение проводят

спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

Количественное определение активного вещества. В нормативной документации указывают диапазон нормативных требований. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (ионообменная хроматография) или другими подходящими валидированными методами.

Вирусная безопасность. В ГенЛП, полученных из крови, плазмы крови, органов и тканей человека, должна быть подтверждена вирусная безопасность в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg); антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, 2), антигена р24 ВИЧ-1; антитела к вирусу гепатита С.

Растворители, выпускаемые в комплекте с лиофилизированным препаратом. В качестве растворителей лиофилизированных препаратов используют растворители, разрешенные к медицинскому применению в РФ при соответствующем пути введения, не влияющие на качество препарата.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Условия хранения ГенЛП должны обеспечивать сохранность всех свойств препарата на протяжении регламентированного срока его годности. Препарат должен храниться в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8^0С.

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: $\mathbf{A_m = A/n}$.

Активность объемная *(Activity, concentration, Volume activity*) – отношение активности (A) радионуклида в препарате (образце) к объёму (V) препарата (образца). Обозначается: $\mathbf{A_V = A/V.}$

Активность удельная *(Activity, specific)* – для определённого изотопа или смеси изотопов: активность вещества (A), отнесённая к его массе (m). Обозначается: $\mathbf{A = A/m}$.

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: $\mathbf{T_{1/2}}$.

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 аннигилляционным 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 эВ=1,60219 × 10^{-19} Дж (приближенно) ≈ 0,16 аДж. Соответственно 1 кэВ≈1,6 × 10^{-16} Дж = 0,16 фДж; 1 МэВ≈1,6 × 10^{-13} Дж=0,16 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 аппаратурные спектры, снимаемые в строго воспроизводимых условиях; их используют для определения подлинности радионуклидов в РФЛП.

Подлинность радионуклида в препарате считают подтверждённой, если аппаратурный 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 ln2 ~ 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:

$$A = \frac{A_{абс}}{1 - A_{абс}\tau},$$

где $A_{абс}$ – 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 ($T_{½}$), 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:

$$R_{корр} = \frac{R\frac{t - \ln 2}{T_{1/2}}}{1 - \exp\left(-\frac{t - \ln 2}{T_{1/2}}\right)},$$

где $R_{корр}$ – 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 авторадиографией 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.

Стереоизомерная 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 ЕЭ/V, где V – максимальная доза препарата в мл в конце срока годности (наибольшая по объему 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 апирогенным. 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.

Приложение 1

ТАБЛИЦА ОСНОВНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАДИОНУКЛИДОВ

Обозначения:

e_A = электроны Оже
ce = электроны конверсии
β^- = электроны
β^+ = позитроны
γ = гамма-излучение
X = рентгеновское излучение

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**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 (I) (макс: 0.019)	100			
Углерод-11 (^{11}C)	20.385 (20) мин	β^+	0.386 (I) (макс: 0.960)	99.8	γ	0.511	199.5 (II)
Азот-13 (^{13}N)	9.965 (4) мин	β^+	0.492 (I) (макс: 1.198)	99.8	γ	0.511	199.6 (II)
Кислород-15 (^{15}O)	122.24 (16) с	β^+	0.735 (I) (макс: 1.732)	99.9	γ	0.511	199.8 (II)
Фтор-18 (^{18}F)	109.77 (5)мин	β^+	0.250 (I) (макс: 0.633)	96.7	γ	0.511	193.5 (II)
Фосфор-32 (^{32}P)	14.26 (4) сут	β^-	0.695 (I) (макс: 1.71)	100			
Фосфор-33 (^{33}P)	25.34 (12) сут	β^-	0.076 (I) (макс: 0.249)	100			
Сера-35 (^{35}S)	87.51 (12) сут	β^-	0.049 (I) (макс: 0.167)	100			
Хром-51 (^{51}Cr)	27.7025 (24) сут	e_A	0.004	67	X	0.005	22.3
					γ	0.320	9.9
Кобальт-56 (^{56}Co)	77.27 (3) сут	e_A	0.006	47	X	0.006-0.007	25
		β^+	0.179 (I)	0.9	γ	0.511	38.0 (II)
			0.631 (I)	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_A+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

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
Кобальт-58 (^{58}Co)	70.86 (7) сут	e_A	0.006	49.4	X	0.006-0.007	26.3
		β^+	0.201 [I]	14.9	γ	0.511	29.9 [II]
						0.811	99.4
						0.864	0.7
						1.675	0.5
Кобальт-60 (^{60}Co)	5.2714 (5) лет	β^-	0.096 [I] (макс: 0.318)	99.9	γ	1.173	100.0
						1.333	100.0
Медь-62 (^{62}Cu)	9.67 мин	β^+	1.316 (макс: 2.926)	97.2	X	0.007	0.709
		e_A	0.007	1.138			
					γ	0.511	194.86
						0.875	0.15
						1.173	0.342
Медь-64 (^{64}Cu)	12.7 час	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
		e_A	0.007	22.66			
					γ	0.511	34.79
						1.345	0.473
Галлий-66 (^{66}Ga)	9.49 (7) час	e_A	0.008	21	X	0.009-0.010	19.1
		β^+	0.157 [I]	1	γ	0.511	112 [II]
			0.331 [I]	0.7		0.834	5.9
			0.397 [I]	3.8		1.039	37
			0.782 [I]	0.3		1.333	1.2
			1.90 [I]	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
						4.807	1.8
Галлий-67 (^{67}Ga)	3.2612 (6) сут	e_A	0.008	62	X	0.008-0.010	57
		ce	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
						0.888	0.15
Германий-68 (^{68}Ge) в равновесии с	270.82 (27) сут	e_A	0.008	42.4	X	0.009-0.010	44.1

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
галлием-68 (^{68}Ga)	(^{68}Ga: 67.629 (24) мин)	β^+	0.353 [1]	1.2	γ	0.511	178.3
			0.836 [1]	88.0		1.077	3.0
Галлий-68 (^{68}Ga)	67.629 (24) мин	e_A	0.008	5.1	X	0.009-0.010	4.7
		β^+	0.353 [1]	1.2	γ	0.511	178.3
			0.836 [1]	88.0		1.077	3.0
Криптон-81m (^{81m}Kr)	13.10 (3) с	ce	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_A	0.011	31.3	X	0.013-0.014	57.2
		ce	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 [1]	1.8		0.510	5.3
			0.447 [1]	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
		ce	0.51	0.066	X	0.013-0.015	55
					γ	0.514	99,3
Стронций-89 (^{89}Sr) в равновесии с Иттрием-89m (^{89m}Y)	50.53 (7) сут	β^-	0.583 [1] (макс: 1.492)	99.99	γ	0.909	0.01
	(^{89m}Y: 16.06 (4) с)						
Стронций-90 (^{90}Sr) в равновесии с Иттрием-90 (^{90}Y)	28.74 (4) лет	β^-	0.196 [1] (макс: 0.546)	100			
	(^{90}Y: 64.10 (8) час)						
Иттрий-90 (^{90}Y)	64.10 (8) час	β^-	0.934 [1] (макс: 2.280)	100			
Молибден-99 (^{99}Mo) в равновесии с Технецием-99m (^{99m}Tc)	65.94 (1) час	β^-	0.133 [1]	16.4	X	0.018-0.021	3.6
			0.290 [1]	1.1			
			0.443 [1]	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

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
Технеций-99m (^{99m}Tc)	6.01 (1) час	ce	0.002	74	X	0.018-0.021	7.3
		e_A	0.015	2.1	γ	0.141	89.1
		ce	0.120	9.4			
			0.137-0.140	1.3			
Технеций-99 (^{99}Tc)	2.11 × 10^5 лет	β^-	0.085 (I) (макс: 0.294)	100			
Рутений-103 (^{103}Ru) в равновесии с Родием-103m (^{103m}Rh)	39.26 (2) сут	e_A+ce	0.017	12	X	0.020-0.023	9.0
		ce	0.030-0.039	88.3	γ	0.497	91
	(^{103m}Rh: 56.114 (20) мин)					0.610	5.8
		β^-	0.031 (I)	6.6			
			0.064 (I)	92.2			
Индий-110 (^{110}In)	4.9 (1) час	e_A	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_A	0.019	5.3	X	0.023-0.026	27.8
		β^+	1.015 (I)	61	γ	0.511	123.4 (II)
						0.658	97.8
						2.129	2.1
Индий-111 (^{111}In)	2.8047 (5) сут	e_A	0.019	15.6	X	0.003	6.9
						0.023-0.026	82.3
		ce	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	ce	0.162	40	X	0.023-0.027	36.3
			0.186-0.190	40			
					γ	0.190	15.6
		β^-	0.777 (I) (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 Теллуром-121 (^{121}Te)	154.0 (7) сут	e_A	0.003	88.0	X	0.026-0.031	50.5
			0.022-0.023	7.4			
					γ	0.212	81.4
		ce	0.050	33.2		1.102	2.5
	(^{121}Te: 19.16		0.077	40.0			

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
	(5) сут)						
			0.180	6.1			
Теллур-121 (^{121}Te)	19.16 (5) сут	e_A	0.022	11.6	X	0.026-0.030	75.6
					γ	0.470	1.4
						0.508	17.7
						0.573	80.3
Йод-123 (^{123}I)	13.27 (8) час	e_A	0.023	12.3	X	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
						0.529	1.4
						0.538	0.4
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_A	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_A+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_A	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 [II]
		β^-	0.109 [I]	3.6		0.666	33
			0.290 [I]	32.1		0.754	4.2
			0.459 [I]	8.0		0.880	0.8
						1.420	0.3
		β^+	0.530 [I]	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

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
		β^-	0.069 (1)	2.1		0.284	6.1
			0.097 (1)	7.3		0.365	81.7
			0.192 (1)	89.9		0.637	7.2
						0.723	1.8
Ксенон-131m (^{131m}Xe)	11.84 (7) сут	e_A	0.025	6.8	X	0.004	8.3
						0.030	44.0
		ce	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 (1)	3.8	γ	0.530	87
			0.162 (1)	3.2		0.875	4.5
			0.299 (1)	4.2		1.298	2.4
			0.441 (1)	83			
Ксенон-133 (^{133}Xe)	5.243 (1) сут	e_A	0.026	5.8	X	0.004	6.3
						0.031	40.3
		ce	0.045	55.1		0.035	9.4
			0.075-0.080	9.9			
					γ	0.080	38.3
		β^-	0.101 (1)	99.0			
Ксенон-133m (^{133m}Xe) (распадается до Ксенона-133)	2.19 (1) сут	e_A	0.025	7	X	0.004	7.8
						0.030	45.9
		ce	0.199	64.0		0.034	10.6
			0.228	20.7			
			0.232	4.6	γ	0.233	10.0
Йод-135 (^{135}I) (распадается до Ксенона-135)	6.57 (2) час	β^-	0.140 (1)	7.4	γ	0.527	13.8
			0.237 (1)	8		0.547	7.2
			0.307 (1)	8.8		0.837	6.7
			0.352 (1)	21.9		1.039	8.0
			0.399 (1)	8		1.132	22.7
			0.444 (1)	7.5		1.260	28.9
			0.529 (1)	23.8		1.458	8.7
						1.678	9.6
						1.791	7.8
Ксенон-135 (^{135}Xe)	9.14 (2) час	ce	0.214	5.5	X	0.031-0.035	5.0
		β^-	0.171	3.1	γ	0.250	90.2
			0.308	96.0		0.608	2.9
Цезий-137 (^{137}Cs) в равновесии с Барием-137m (^{137m}Ba)	30.04 (3) лет	e_A	0.026	0.8	X	0.005	1
						0.032-0.036	7
		ce	0.624	8.0			
	(^{137m}Ba: 2.552 (1) мин)		0.656	1.4	γ	0.662	85.1
		β^-	0.174 (1)	94.4			
			0.416 (1)	5.6			

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**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
		ce	0.021	21.7		0.047	12.4
			0.055	43.2			
			0.095	6.44	γ	0.070	4.85
						0.103	29.8
Гольмий-166 (^{166}Ho)	26.8 час	β^-	0.651 (макс: 1.773)	48.7	X	0.007	8.3
			0.694 (макс: 1.854)	50.0		0.048	3.1
		e_A	0.006	27.8		0.049	5.5
		ce	0.023	11.5			
			0.071	26.5	γ	0.081	6.71
			0.078	6.44			
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_A	0.044	0.27			
		ce	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_A	0.007	6.8	γ	0.155	15.61
		ce	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}T1)	7.42 час	ce	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	ce	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 (1)	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

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**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_A	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_A	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_A	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_A	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_A	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

		Электронная эмиссия			Фотонная эмиссия		
Радионуклид	**Период полураспада**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**	**Тип**	**Энергия (МэВ)**	**Вероятность (на 100 распадов)**
			5.747	9.0			
		e_{A}	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			