

Лекція 7

Тема лекції: “Контроль якості ентеросорбентів”

Мета лекції – проаналізувати відомі методи дослідження якості ентеросорбентів на етапі дореєстраційних досліджень та на етапі набуття препаратом статусу офіційно зареєстрованого лікарського засобу.

План лекції:

- 1. Контроль параметрів препаратів адсорбційної дії.**
- 2. Ідентифікація адсорбентів методами хімічних випробувань або спектральних досліджень.**
- 3. Адсорбційна активність препаратів.**

Текст лекції

1. Контроль параметрів препаратів адсорбційної дії

Для розробників препаратів сорбційної дії, а також для працівників контрольно-аналітичних служб важливими є питання стандартизації та перевірки якості медичних сорбентів.

Дослідження будь-якого нового препарату можна поділити на дореєстраційні і такі, що виконуються після набуття препаратом статусу офіційно зареєстрованого лікарського засобу. Дореєстраційні дослідження – фізико-хімічні, біологічні, клінічні – мають науковий характер і виконуються згідно з «Методичними рекомендаціями державного експертного центру МОЗ України», якими передбачено розширений перелік випробувань. Зокрема, у фізико-хімічній частині для ентеросорбентів проводять поглиблене вивчення структурно-сорбційних властивостей: визначають хімічний склад, питому поверхню, поруватість, досліджують адсорбційну активність щодо широкого кола тестових речовин [1,2]. Для зареєстрованого препарату з налагодженим промисловим виробництвом виконують періодичний фармацевтичний аналіз згідно з вимогами

методів контролю якості (МКЯ), які містять обмежений перелік обов'язкових випробувань.

Розробникам ентеросорбентів до МКЯ рекомендується включати такі розділи [3]: опис; ідентифікація; розмір частинок; насипна густина; рН водної витяжки; речовини, розчинні у воді; речовини, розчинні у хлористоводневій кислоті (для пероральних сорбентів); специфічні домішки; органічні домішки (речовини, розчинні в етанолі); залишкові розчинники; втрата в масі при висушуванні; залишок після спалювання, або сульфатна зола (для органічних і вуглецевих сорбентів); залишок після прожарювання (для неорганічних сорбентів); важкі метали; миш'як (для неорганічних сорбентів); мікробіологічна чистота; адсорбційна активність; кількісне визначення.

2. Ідентифікація адсорбентів методами хімічних випробувань або спектральних досліджень

Розглянемо особливості фармацевтичного аналізу ентеросорбентів на прикладі препаратів, зареєстрованих в Україні та за кордоном.

Ідентифікація за допомогою хімічних випробувань або спектральних досліджень дає змогу встановити тип сорбенту за хімічною природою – вуглецевий, алюмосилікатний, кремнійорганічний чи інший. Наприклад, ідентифікацію кремнійвмісних сорбентів – Ентеросгелю (ФС 42У-67-62-96) і Силіксу (ФС 42У-82/224-889-00) – виконують за допомогою кольорової реакції утворення кремніймолібденової кислоти. Для ідентифікації вуглецевих сорбентів доцільна реакція на повне спалювання (Карбовіт, ТФС 42У-9-93; вугілля активоване, ДФУ). Для ототожнення Силіксу, а також силіконового полімеру симетикону (USP 30 [66], ВР 2009 [5]) пропонується ІЧ-спектроскопія порівняно зі стандартом. Тотожність Клімонту, сучасної розробки російських науковців, що належить до природних алюмосилікатів, підтверджують ІЧ-спектрофотометрією за положенням основних смуг та паперовою хроматографією [8]. Належність Поліфепану (гідролізного лігніну) до

поліфенольних сполук підтверджують кольоровою реакцію зі спиртовим розчином флороглюцину (ФС 42-2793-97).

Для чіткішої ідентифікації залучають фармако-технологічні випробування. Наприклад, «Розмір частинок» і «Насипну густину» можна віднести до характеристик тотожності, оскільки ці показники бувають різними для окремих видів однакових за хімічною природою сорбентів. Іноді корисною виявляється мікроскопія частинок – їхня форма може бути характерною для даного сорбенту. Розмір частинок характеризує також фармакологічні властивості сорбенту, зокрема, транзит через кишечник і можливість усмоктування [3]. Різні за ступенем полімеризації препарати синтетичних полімерів – ПВП, ПВС, диметикон, а також мікрокристалічну целюлозу (МКЦ) – можна ідентифікувати віскозиметричним методом (для диметикону і МКЦ – згідно з ВР 2009). Інколи як тест ідентифікації розглядають дотримання вимог розділу «Адсорбційна активність».

Випробування на чистоту. Оскільки ентеросорбенти вживають у великих дозах (десятки грамів за один раз), вельми важливим є визначення вмісту домішок. Як відомо, класичний прийом хімічного аналізу полягає в попередньому розчиненні досліджуваного препарату в відповідному розчиннику. Натомість, ентеросорбенти під час аналізу в розчинний стан не переводять: домішки визначають у розчині (фільтраті чи центрифугаті), одержаному після обробки препарату дистильованою водою, хлористоводневою кислотою, іноді спиртом, тобто визначають речовини, десорбовані з поверхні сорбенту. Цей підхід виправданий за умов стабільності ентеросорбенту в такому агресивному розчиннику, як шлунковий сік [7].

Розділ «Специфічні домішки» – це контроль технологічних домішок: неорганічних катіонів й аніонів та індивідуальних органічних речовин. Наприклад, ДФУ висуває жорсткі вимоги до чистоти вугілля активованого [8]: у складі препарату нормується вміст хлоридів, сульфатів, сульфідів, заліза, міді, свинцю, цинку, миш'яку; речовин, розчинних у воді; речовин, розчинних у кислоті; забарвлених

речовин, розчинних у лузі; речовин, розчинних у 96 % спирті, та флуоресціюючих речовин.

Норми вмісту домішок у деяких препаратах сорбційної дії наведено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1. Вимоги до чистоти ентеросорбентів

Сорбент	Вміст, %, не більше				
	залізо	хлориди	сульфати	важкі метали	миш'як
Colloidal Anhydrous Silica, BP 2009	-	0,025	-	0,0025	-
Силікс	0,006	0,025	0,02	0,001	0,0001
Ентеросгель	-	0,002	-	0,001	-
Поліфепан	0,06	-	0,05	0,001	-

Загальний контроль органічних неспецифічних домішок здійснюють через нормування вмісту речовин, розчинних в етанолі (або в ефірі). Визначають масу залишку, що утворюється після висушування відфільтрованого 96 % спирту, певний об'єм якого кип'ятили з наважкою вугілля активованого (ДФУ, не більше 0,5 %), або масу речовини, що залишається після висушування елюату, одержаного в результаті пропускання ефіру через хроматографічну колонку, заповнену мікрокристалічною целюлозою (BP 2009, не більше 0,05 %). Можливий інший підхід до визначення органічних домішок – за здатністю до окиснення перманганатом калію відфільтрованої водної витяжки.

Тест «Залишкові розчинники» проводять тоді, коли у виробництві сорбенту використовували неорганічні й органічні розчинники. «Втрата в масі при висушуванні» може бути обумовлена наявністю залишкових розчинників, зазвичай води. Наприклад, для Поліфепану цей показник

становить не менше 60,0 % і не більше 70,0 %. Сухий залишок після висушування ентеросгелю має становити від 7,5 до 11,0 %.

Тест «Залишок після спалювання» (або «Сульфатна зола») характеризує неорганічну частину препарату і застосовується, як правило, для органічних і вуглецевих сорбентів. Для неорганічних сорбентів виконується випробування «Залишок після прожарювання» або «Втрата в масі при прожарюванні», яка, наприклад, для Силіксу становить не більше 5,0 %. Часто виконання цього тесту поєднують із визначенням важких металів.

Для ентеросорбентів важливим є тест на розчинення у хлористоводневій кислоті, оскільки вона присутня у шлунку: під час кип'ятіння в 0,1 М розчині HCl сорбент не повинен втрачати масу більше, ніж на певну задану величину [3]. Згідно з ВР 2009 встановлюють норму маси залишку, який утворюється в результаті висушування промивної рідини після обробки МКЦ хлористоводневою кислотою (не більше 2,0 %). Відповідно до вимог ДФУ вугілля активоване обробляють розведеною нітратною та хлористоводневою кислотами, маса сухого залишку після висушування фільтрату не більше 3 %.

До критеріїв чистоти належить тест «рН водної витяжки», який є суттєвим для ентеросорбентів, оскільки кислотні або лужні домішки можуть впливати на рН у шлунку. Випробування виконують потенціометрично або нормують об'єм кислоти (лугу), необхідний для зміни кольору індикатора.

3, Адсорбційна активність препаратів

Адсорбційна активність є ключовим випробуванням для сорбентів. Для контролю якості визначають величину адсорбції в одній точці адсорбційної кривої (метод точкових вимірювань).

Для оцінки «загальної» адсорбційної активності здавна застосовують тест з водним розчином метиленового синього, який увійшов до фармакопей різних країн. Наприклад, згідно

з ГФ Х (стаття 134) 0,1 г порошку вугілля активованого мають знебарвлювати при струшуванні 16 мл 0,15 % розчину метиленового синього. Цей напівкількісний тест простий у виконанні, дає візуальний результат. За умов повного знебарвлення сорбція становить не менше 240 мг метиленового синього на 1 г вугілля. Випробування з метиленовим синім застосовують для глини білої, ГФ Х (стаття 109): за умов повного поглинання барвника адсорбційна активність препарату становить не менше 14 мг/г. Згідно з USP 30 для Атапульгіту (силікату магнезіо-алюмінію, структурної основи глинистого мінералу палигорскіту) норму адсорбційної активності, не менше 65 мг/г, встановлюють шляхом візуального порівняння інтенсивності забарвлення дослідного розчину метиленового синього зі стандартним розчином. Аналогічне випробування для Атапульгіту з метиленовим синім виконують за ВР 2009 (не менше 60 мг/г). Адсорбція метиленового синього Клімонтом для різних серій коливається у межах 10–21 мг/г [8]. Згідно з ФС 42-2793-97 адсорбційна здатність Поліфепану за цим барвником становить не менше 30 мг/г. Тест з метиленовим синім застосований для визначення адсорбційної активності Карбовіту (ТФС 42У-9-93). Натомість, для вугілля активованого у ДФУ і ВР 2009 запропонований тест із феназоном (антипірином), залишкову концентрацію якого в розчині визначають броматометрично. У 100 г вугілля активованого, у перерахунку на суху речовину, має адсорбуватися не менше 40 г феназону [5,8].

Метиленовий синій є низькомолекулярною речовиною ($M=374$ Да), яка належить до катіонних органофільних барвників, тому переважно зв'язується сорбентами, що мають від'ємно заряджену поверхню (наприклад, кремнеземом), а також гідрофобними пористими сорбентами (вугіллям). Тому показника адсорбції метиленового синього недостатньо для характеристики специфічної активності сорбенту. Якщо сорбент призначений для сорбції білків, алкалоїдів або важких чи радіоактивних металів, то саме сорбцію цих речовин треба контролювати при визначенні специфічної адсорбційної активності.

Наприклад, для високодисперсного діоксиду кремнію (Силіксу) показником специфічної активності є адсорбція білків. Наважку субстанції масою 0,2 г струшують протягом 0,5 години з 25 мл 0,6 % розчину желатини, потім центрифугують і в центрифугаті біуретовим методом фотоколориметрично вимірюють залишкову концентрацію желатини, адсорбція якої має становити не менше 220 мг/г (ДФУ). Визначення адсорбції желатини і метиленового синього використовують для контролю якості синтетичного цеоліту NaA [9]. Дотримуючись умов, наведених у МКЯ на Силікс, автори одержали такі результати: адсорбційна здатність цеоліту за желатиною становить 270,4 мг/г, за метиленовим синім – 7,42 мг/г. Адсорбційну активність ентеросгелю випробовують стосовно двох барвників – конго червоного і метилового оранжевого: активність препарату має бути не менше 3,2 мкмоль/г (з урахуванням молярних мас барвників – 2,2 мг/г за конго червоним і 1,1 мг/г – за метиловим оранжевим). За USP 30 для вугілля активованого, окрім визначення адсорбції метиленового синього (не менше 200 мг/г, йодометрично, зворотне титрування), досліджують адсорбцію стрихніну (не менше 100 мг/г, відсутність осаду після додавання до фільтрату розчину $K_2[HgI_4]$).

З наведених даних видно, що активоване вугілля за адсорбцією метиленового синього набагато перевершує кремнійвмісні (Силікс, Ентеросгель) й алюмосилікатні та глинисті сорбенти (цеоліти, біла глина). Отже, застосування метиленового синього як тест-речовини для вугілля цілком виправдано, тоді як для інших сорбентів випробування з цим барвником не відображає їхні специфічні адсорбційні властивості і тому в МКЯ на ці препарати слід уводити випробування з іншими адсорбтивами.

Для вибору підхожих сорбатів на стадії доресстраційних досліджень проводять скринінг адсорбційної активності щодо широкого набору маркерних речовин (табл. 7.2). При цьому, однак, варто пам'ятати, що не існує прямого зв'язку між адсорбційною активністю ентеросорбентів різних типів *in vitro* та їх терапевтичною ефективністю в дослідях *in vivo* з моделями патологічних станів у тварин і, тим більше, у

клініці. Тому результати стендових випробувань слід використовувати скоріш для порівняння поглинальної активності ентеросорбенту, що розробляється, та відомих аналогів [1].

Таблиця 7.2. Рекомендований перелік маркерних речовин [1]

Речовина, молекулярна маса (Да)	Примітка
<i>I. Різноманітні барвники</i>	
Метиленовий синій (374 Да)	Модель низькомолекулярного токсину, катіон (основа)
Конго червоний (697 Да)	Мала молекула, аніон (кислота)
Феноловий червоний (376 Да)	Мала молекула, у нейтральному розчині – цвіттер-іон
<i>II. Маркери біологічної активності</i>	
Креатинін (113 Да)	Низькомолекулярний азотистий шлак
Вітамін В ₁₂ (1355 Да)	Модель «середніх молекул»
Некон'югований білірубін (585 Да) у 3% розчині сироваткового альбуміну людини	Маркер печінкової недостатності
Сироватковий альбумін людини (67 кДа)	Маркер адсорбції білків
Желатина (≈350 кДа)	Білок з великою

	молекулярною масою без регулярної структури
Ліпополісахарид бактеріальної стінки кишкової палички (ЛПС, бактеріальний ендотоксин) (400–4000 кДа)	Високомолекулярний токсин

Закінчення табл. 7.2

Речовина, молекулярна маса (Да)	Примітка
<i>III. Лікарські речовини та ксенобіотики</i>	
Феназон (антипірин) (188 Да)	Тест-речовина для оцінки ємності медичного активованого вугілля
Ізоніазид (137 Да)	Маркер медикаментозного передозування
Рифампіцин (823 Да)	– «–
Натрію барбітал (206 Да)	Маркер гострого отруєння барбітуратами
Фенол (94 Да)	Органічна отрута
Свинець (207 Да)	Важкий метал
Цезій (133 Да)	Радіонуклід

Спробу встановити специфічність адсорбційних властивостей найпоширеніших сорбентів – активованого вугілля, вугілля марки СКН, МКЦ, Лігносорбу, Полісорбу і харчової домішки на основі хітозану – зроблено в роботі [10], в якій досліджували ступінь видалення (у %) цими

препаратами з сироватки крові загального білка, альбумінів, глобулінів, глюкози, холестерину, тригліцеридів, сечовини, натрію, кальцію та фосфору.

Незважаючи на вплив конкурентної адсорбції, одержані результати можуть бути корисними для стандартизації цих препаратів. Встановлено, що серед усіх тест-речовин найкраще адсорбується холестерин, першу трійку найактивніших сорбентів для якого становлять Полісорб (46,2 %), МКЦ (22,0 %), активоване вугілля (19,5 %). Тригліцериди сорбуються таким чином: Полісорб (16,4 %), МКЦ (11,4 %), Лігносорб (10,6 %). Полісорб (силікс), окрім того, виявився найактивнішим щодо загального білка (9,3 %) і натрію (13,0 %). Найкращі сорбенти для сечовини – Хітозан (12 %) та Лігносорб (9,3 %). Натомість майже не виявив адсорбційних властивостей стосовно цього набору речовин СКН. Що ж до Полісорбу, то наведені результати цілком збігаються з одержаними нами даними про ефективну адсорбцію холестерину і тригліцеридів з сироватки крові [74]. Оскільки в модельних розчинах холестерин і тригліцериди з Полісорбом не взаємодіють, було зроблено припущення, що з сироватки ці метаболіти адсорбуються у складі комплексів з білком – ліпопротеїнів.

Кількісне визначення. Визначення хімічного складу ентеросорбентів проводять у разі необхідності. Так, цей тест недоцільний для хімічно однорідних сорбентів, наприклад, вуглецевих. Кількісне визначення не виконують для МКЦ (ВР 2009) і поліфепану. Натомість для органосилоксанів це випробування є необхідним – для характеристики балансу органічної та неорганічної частин. Наприклад, у складі ентеросгелю встановлюють вміст кремнію і вуглецю. Кремній у вигляді діоксиду кремнію визначають гравіметрично, виконуючи мінералізацію препарату шляхом нагрівання з концентрованими H_2SO_4 і HNO_3 з подальшим прожарюванням за температури 1000°C . Вміст вуглецю встановлюють за допомогою елементного аналізатора CHN або в інший спосіб [69]. Для кількісного визначення кремнійорганічної сполуки диметикону USP 30 пропонує ІЧ-

спектроскопію порівняно зі стандартом, межі кількісного вмісту при цьому становлять від 97,0 до 103,0 %.

Для кількісного визначення силіку, який є індивідуальною неорганічною речовиною сталого складу, використано гравіметричний метод. Після нагрівання попередньо прожареної наважки препарату з концентрованими H_2SO_4 і HNO_3 з подальшим прожарюванням за 950–1000°C проба містить практично хімічно чистий SiO_2 , якого в препараті має бути не менше 99,0 %. Інший підхід використано у USP 30: вміст SiO_2 у колоїдному пірогенному діоксиді кремнію визначають через масу залишку, що утворюється після обробки препарату фтористоводневою кислотою і видалення леткого фториду кремнію (не менше 99,0 % і не більше 100,5 %).

Кількісне визначення обов'язкове для комбінованих препаратів, а також для природних сорбентів, які є сумішшю мінералів. Наприклад, для кількісного визначення Клімонту (містить цеоліти, мінерали родини монтморилоніту–каолініту, а також кальцит і кварц) запропонована оцінка вмісту заліза (від 2 до 6 %) й алюмінію (від 11 до 15 %) комплексометрично, а також кремнію (від 53 до 65 %) спектрофотометрично у вигляді відновленого кремніймолібдатного комплексу [68].

Узагальнюючи тему, яка стосується якості ентеросорбентів можна виділити головне:

- ключовою кількісною характеристикою для препаратів даної групи є показник адсорбційної активності; розробникам ентеросорбентів до МКЯ слід приділяти увагу насамперед визначенню специфічної адсорбційної активності;
- через великі терапевтичні дози ентеросорбентів жорсткі вимоги висуваються до їхньої чистоти; домішки визначають у фільтраті після обробки сорбенту водою або розчином хлористоводневої кислоти.

Висновки

1. Ключовою кількісною характеристикою відомих препаратів є показник адсорбційної активності. Для оцінки

«загальної» адсорбційної активності сорбентів застосовують тест з водним розчином метиленового синього, який увійшов до фармакопей різних країн.

2. Для високодисперсного діоксиду кремнію (Силіксу) показником специфічної активності є адсорбція білків. Наважку субстанції масою 0,2 г струшують протягом 0,5 години з 25 мл 0,6 % розчину желатини, потім центрифугують і в центрифугаті біуретовим методом фотоколориметрично вимірюють залишкову концентрацію желатини, адсорбція якої має становити не менше 220 мг/г.

3. Активоване вугілля за адсорбцією метиленового синього набагато перевершує кремнійвмісні (Силікс, Ентеросгель) й алюмосилікатні та глинисті сорбенти (цеоліти, біла глина). Застосування щодо нього метиленового синього як тест-речовини цілком виправдано, тоді як для інших сорбентів випробування з цим барвником не відображає їхні специфічні адсорбційні властивості.

4. Для кількісного визначення елементного складу Силіксу, який є індивідуальною неорганічною речовиною сталого складу, використовують гравіметричний метод.

Контрольні запитання

1. Які методи досліджень використовують для ідентифікації хімічної природи адсорбенту?
2. Вміст яких сполук контролюють у складі вуглецевих адсорбентів?
3. Які барвники застосовують для контролю адсорбційної активності Ентеросгелю?
4. Чи існує прямий зв'язок між адсорбційною активністю ентеросорбентів різних типів *in vitro* та їх терапевтичною ефективністю в дослідях *in vivo*.

Література

1. Доклиническое изучение энтеросорбентов. Метод. рекомендации / В.Г. Николаев, Н.Т. Картель, Е.А. Посохова и др. – Киев: Гос. эксперт. центр МЗ Украины, 2010. – 56 с.
2. Николаев В.Г., Михаловский С.В., Гурина Н.М. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия (Обзор) // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 4. – С. 3–17.
3. Гурина Н.М., Бардахівська К.І. Энтеросорбенти як засіб детоксикації організму // Довкілля та здоров'я. – 2007. – № 3. – С.64–66.
4. Энтеросорбция: состояние, проблемы и перспективы применения / В.И. Давыдов, С.С. Ставицкая, В.В. Стрелко, Н.Т. Картель. – Киев: Ин-т сорбции и проблем эндоэкологии АН Украины, 1993. – 68 с.
5. Николаев В.Г., Гурина Н.И. Сорбционные материалы и механизмы действия // Клин. эфферентология (эл. журн.). – 2010.– № 4, <http://www.efferens.dsmu.edu.ua/>; <http://kiulong.com.ua/content/view/66/1/>.
6. Комбинация методов эфферентной терапии в комплексном лечении детей, подвергшихся радиоактивному заражению в результате катастрофы на ЧАЭС. Метод. рекомендации / Н.Г. Кручинский, В.А. Остапенко, С.М. Остапенко и др. – Минск: МЗ Респ. Беларусь, 2001. – 51 с.
7. Николаев В.Г. Энтеросгель. – Киев: Богдана, 2010. – 159 с.
8. Энтеросорбция – механизмы лечебного действия / Н.А. Беляков, А.Б. Соломенников, И.Н. Журавлева и др. // Эфферентная терапия. – 1997. – Т. 3, № 2. – С. 20–26.
9. Геращенко И.И., Ильченко А.В., Пентюк А.А. Перспективы создания лекарств на основе высоко-

- дисперсного кремнезема // Химия, физика и технология поверхности. – 1999. – Вып. 3. – С. 10–14.
10. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Руководство по биологически активным пищевым добавкам. – М.: Триада-Х, 2001. – 232 с.