

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Рудакова Ольга Володимирівна

УДК: 615.453.2:615.015.2:615.07:615.099

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка та стандартизація комбінованого лікарського засобу для
фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації**

226 – Фармація, промислова фармація
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О. В. Рудакова

Науковий керівник Бевз Наталія Юріївна,
кандидат фармацевтичних наук, доцент

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Рудакова О. В. Розробка та стандартизація комбінованого лікарського засобу для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

У дисертаційній роботі запропоновано теоретичне та експериментальне обґрунтування складу, технології та методів контролю якості комбінованої лікарської форми у вигляді порошку шипучого для орального застосування для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації.

У *першому* розділі узагальнено дані літератури щодо біохімічних перетворень, які відбуваються в організмі людини під час отруєння алкоголем, і фармакотерапії з усунення цих небажаних ефектів. Визначено, що до комплексу симптомів алкогольної інтоксикації належать гострий головний біль, сонливість, слабкість, нудота, іноді з блювотою, пригнічений настрій, тремор рук, порушення концентрації уваги, які виникають внаслідок токсичної дії спиртів або продуктів їх метаболізму на організм людини. Аналіз фармацевтичного ринку лікарських засобів (ЛЗ), застосовуваних для зменшення симптомів алкогольної інтоксикації, засвідчив, що ефективність більшості ЛЗ залежить від вмісту активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), які найчастіше впливають на окремі складові патогенезу патології.

У *другому* розділі наведено характеристику АФІ та допоміжних речовин, обраних для виготовлення лікарської форми. Наведено методики фармакотехнологічних, фізико-хімічних, фармакологічних і мікробіологічних досліджень, використаних під час розроблення оптимального складу та раціональної технології порошків для орального застосування. Для розроблення методик контролю якості обрано сучасні методи аналізу, серед яких: абсорбційна спектрофотометрія у видимій та ультрафіолетовій областях (спектрофотометрія),

тонкошарова хроматографія (ТШХ), високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), напівмікрометод визначення води (метод К. Фішера) тощо.

У *третьому* розділі з урахуванням сучасного ринку та фармакологічних властивостей речовин здійснено вибір АФІ для створення комбінованого лікарського засобу для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації. Обрано глутамінову кислоту – складову циклу Кребса, яка поліпшує енергозабезпечення клітин і необхідна для знешкодження і виведення з організму аміаку, що накопичується в організмі в разі алкогольної інтоксикації; ацетилсаліцилову кислоту як засіб для купірування больового синдрому; аскорбінову кислоту – для забезпечення антистресової дії засобу; гліцин – для знешкодження токсичних продуктів розпаду етилового спирту, зокрема ацетальдегіду, та зниження психоемоційної напруги й агресивності, покращення настрою, розумової працездатності та нормалізації сну.

У процесі створення нового комбінованого засобу одним із найперших етапів є дослідження властивостей АФІ. Для більш швидкого всмоктування засобу запропоновано у склад лікарського препарату ввести лимонну кислоту, а для утворення шипучого напою, нейтралізації соляної кислоти шлунку, зниження пошкоджувальної дії кислот на слизову шлунку, усунення метаболічного ацидозу та вирівнювання кислотно-лужного балансу в організмі використовувати натрію гідрокарбонат, для коригування смаку доцільно використати вуглеводи.

Для оцінювання сумісності компонентів суміші було проведено експериментальні дослідження гігроскопічності, хімічної взаємодії / хімічної стабільності та визначення окисно-відновного потенціалу. Експериментальні дослідження гігроскопічності свідчать, що глутамінову кислоту, аскорбінову кислоту та натрію гідрокарбонат можна віднести до негігроскопічних речовин (середнє значення збільшення маси складає менше 0,1 %); гліцин та ацетилсаліцилову кислоту – до слабо гігроскопічних (збільшення в масі становить від 0,2 % до менше 2 %); сорбіт, лимонну кислоту безводну – до гігроскопічних (збільшення в масі становить від 2 % до менше 15 %), а фруктозу можна розглядати

як таку речовину, що розпливається у поглиненій із повітря волозі.

У результаті визначення хімічної взаємодії компонентів методом спектрофотометрії у водному і лужному середовищі з'ясовано, що найбільш вірогідний є вплив лужного середовища на ацетилсаліцилову та аскорбінову кислоти, який більш суттєво проявляється за наявності вологи.

Вибираючи коригенти смаку, для порівняння використовували такі вуглеводи, як фруктоза, сахароза, глюкоза або сорбіт і перевіряли їх хімічну сумісність з амінокислотами. Експериментально доведено, що тільки за використання сорбіту не відбувається реакції цукроамінної конденсації (реакції Майяра). Перевіряючи хімічну сумісність аскорбінової кислоти з амінокислотами, з'ясували, що гліцин – нейтральна амінокислота, здатна взаємодіяти з вітаміном С; глутамінова кислота, як двоосновна кислота, не проявила здатності до взаємодії.

Для запобігання можливості окиснення діючих компонентів композиції киснем повітря вивчено окисно-відновні потенціали сполук і з'ясовано, що найбільш лабільною речовиною для процесу окислення в суміші є аскорбінова кислота, яка може за певних умов взаємодіяти з гліцином. З огляду на те, що відновний компонент ЛЗ (аскорбінова кислота) може бути окислений киснем повітря, а медіатором цього процесу може бути лужне середовище (натрію гідрокарбонат), вирішено відділити лужну компоненту від інших АФІ.

За результатами досліджень ухвалено рішення розділити АФІ на 2 пакети та відокремити натрію гідрокарбонат і гліцин, які можуть взаємодіяти з аскорбіновою та ацетилсаліциловою кислотами відповідно.

З огляду на значний ступінь гігроскопічності деяких складових порошків (сорбіт, лимонна кислота) та здатність вступати у хімічні реакції в присутності надлишкової кількості вологи (лимонна кислота) матеріалом для первинного пакування одержаних порошків обрано буфлен.

Виявлено, що на зміну смакових відчуттів засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації впливає кількість сорбіту, лимонної кислоти і натрію гідрокарбонату. З метою визначення органолептичної оцінки запропонованого препарату порівнювали його з ЛЗ, присутніми на фармацевтичному ринку для

лікування алкогольної інтоксикації: Медихронал® (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), Алка-Зельтцер (Bayer Bitterfeld GmbH, Німеччина), Глутаргін Алкоклін (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»), Алька-Прим® (Фармацевтичний завод «Polpharma» S.A., Польща).

Проведені дослідження дозволили обрати раціональний склад комбінованого лікарського засобу для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації у формі порошку шипучого для приготування орального розчину (з розподілом суміші АФІ на два саше-пакети, масою 4000 мг кожен) під умовною назвою «Аміноацетаск».

Результати дослідження технологічних властивостей (насипна маса, насипний об'єм, текучість) експериментальних сумішей пакета № 1 та пакета № 2 з використанням заявлених субстанцій свідчать про отримання порошків із заданими показниками якості, що забезпечуватиме однорідність фасування. Обраний метод безпосереднього змішування порошків, який дозволяє зменшити ризик порушення однорідності вмісту діючих речовин, є економічний і зменшує працезатрати під час виготовлення комбінованого засобу у формі порошку шипучого для усунення симптомів алкогольної інтоксикації. Визначено основні стадії та розроблено критичні параметри технологічного процесу. За отриманими результатами розроблено ресурсозберігальну технологію виробництва препарату.

За результатами фармакологічних досліджень обраного складу порошку доведено, що запропонований засіб проявляє статистично значущу активність на моделях алкогольного гепатозу й одноразової алкогольної інтоксикації, що не поступається, а навіть перевищує сучасні комерційні засоби для фармакокорекції похмільного синдрому. У відтворенні експериментальної моделі алкогольного гепатозу досліджуваний тест-зразок у добовій дозі 1,24 г/кг за внутрішньошлункового введення в лікувально-профілактичному режимі впродовж 30 діб призводив до вірогідного зменшення активності аланінамінотрансферази в сироватці крові на 33,6 %, зменшення вмісту ТБК-АП на 26,4 % та збільшення вмісту відновленого глутатіону на 36,0 % проти контрольної патології. У відтворенні гострої етанольної інтоксикації середньої тяжкості досліджуваний тест-зразок у дозі 1,24 г/кг за одноразового введення призводив до вірогідного

збільшення суми поведінкових активностей у щурів у тесті «відкрите поле» в день інтоксикації на 47,3 %, а за повторного введення через добу – на 36,6 % проти негативного контролю.

Доведено, що склад заявленого комбінованого засобу є оптимальний, бо зменшення маси компонентів не забезпечує належний рівень фармакологічної активності ЛЗ. Збільшення маси компонентів до максимально можливої терапевтичної дози недоцільне через стабілізацію терапевтичної дії, рівень якої суттєво не змінюється в разі збільшення діючих речовин, а отже, призводить до збільшення собівартості засобу.

У четвертому розділі описано етапи стандартизації комбінованого порошку шипучого для приготування розчину для орального застосування, що їх проводили відповідно до вимог загальних статей Державної фармакопеї України «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» (*Praeparationes liquidae perorales*) та «Порошки для орального застосування» (*Pulveres perorales*). До специфікації ЛЗ «Порошок шипучий для орального розчину» було введено такі показники якості, як опис, ідентифікація, однорідність маси, однорідність дозованих одиниць, супровідні домішки, втрата в масі при висушуванні, мікробіологічна чистота та кількісне визначення.

Для одночасної ідентифікації гліцину та глютамінової кислоти розроблено екологічну ТШХ/ВЕТШХ-методику, що дозволяє ідентифікувати не лише амінокислоти, а й аскорбінову кислоту. Методика полягає у хроматографуванні розчинів досліджуваних сполук у рухомій фазі *етанол (96 %) – вода (70:30)* та виявленні хроматографічних зон розчином *нінгідрину РІ* за температури 105 °С. Вивчено валідаційні характеристики методики: специфічність, робасність та прецизійність. Проведено визначення граничного вмісту домішок амінокислот – речовин, що відновлюються нінгїдрином; встановлено, що їх вміст не перевищує нормування 0,5 %.

Ідентифіковано сорбіт у комбінованому ЛЗ методом ТШХ за уніфікованою методикою відповідно до вимог Європейської фармакопеї та Державної фармакопеї України.

Уперше розроблено уніфікований підхід для ідентифікації, кількісного визначення аскорбінової і ацетилсаліцилової кислот та супровідних домішок (саліцилової кислоти) методом високоефективної рідинної хроматографії. Дібрано оптимальні хроматографічні умови з урахуванням впливу інших активних і допоміжних речовин ЛЗ, що полягають у використанні колонки розміром $150 \times 4,6$ мм, заповненої силікагелем амінопропілсилільним для *хроматографії Р* (Supelcosil LC-NH₂ фірми «Supelco»), з передколонкою (розмір частинок 3 мкм) та елююванні в рухомій фазі *буферний розчин рН 3,2 – ацетонітрил Р (80:20)* в ізократичному режимі (швидкість рухомої фази складала 1,2 мл/хв; температура колонки – 45°C; об'єм інжекції – 20 мкл, час хроматографування – 10 хв). Виявляли речовини УФ-детектором за довжини хвилі 240 нм. Було досягнуто ефективне хроматографічне розділення аскорбінової, ацетилсаліцилової та саліцилової кислот. Для доведення можливості застосування запропонованої методики в подальшому аналізі порошку шипучого було проведено її валідацію методом «введено-виявлено». У результаті визначення валідаційних характеристик методики таких, як специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, внутрішньолaboratorна точність, робасність, з'ясовано, що отримані значення не перевищують закладених критеріїв прийнятності і методика придатна для аналізу.

Для кількісного визначення компонентів суміші використовували фізико-хімічні методи аналізу, зокрема для гліцину і глютамінової кислоти – способи і прийоми методу спектрофотометрії, що ґрунтуються на реакції утворення забарвленого продукту зі спиртовим розчином нінгідрину. Виявлено, що реакція між амінокислотами і нінгідрином відбувається впродовж 30 хв на киплячий водяній бані, з додаванням різної кількості буферного розчину з рН 6,8 залежно від вмісту пакета. Для підвищення стабільності реакцію взаємодії гліцину з нінгідрином доцільно проводити з додаванням кислоти аскорбінової. Основні валідаційні характеристики – робасність, лінійність, правильність, прецизійність – підтверджують можливість використання цих методик у присутності інших компонентів комбінованих порошків та для проведення контролю якості досліджуваної лікарської форми протягом усього «життєвого циклу».

Проведено тест «Однорідність дозованих одиниць» для всіх діючих речовин ЛЗ «Порошок шипучий для орального розчину» відповідно до вимог ДФУ з використанням методу прямого визначення. З'ясовано, що приймальне число AV для перших 10 пакетів № 1 $L1 \leq 15$ для ацетилсаліцилової кислоти, аскорбінової кислоти, гліцину і глютамінової кислоти.

Результати вивчення мікробіологічної чистоти пакетів № 1 і № 2 засобу для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації на момент їх виготовлення і в процесі зберігання свідчать про відповідність мікробіологічної чистоти лікарського препарату вимогам Державної фармакопеї України впродовж 24 місяців (2 років) зберігання.

Хімічну стабільність порошку шипучого для фармакологічної корекції симптомів алкогольної інтоксикації у пакетах № 1 і 2 з матеріалу для фармацевтичних препаратів (буфлену) досліджували за показниками специфікації розробленого проєкту методів контролю якості (МКЯ) під час зберігання за температури $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ та відносної вологості повітря $(60 \pm 5) \%$. Впродовж усього терміну спостережень, що становив 24 місяці, дослідні зразки пакета № 1 та пакета № 2 мали незначні відхилення від початкових показників і відповідали вимогам проєкту МКЯ.

За результатами виконаних досліджень подано заявку на патент України на винахід № а202200153 від 17.01.22 р. «Комбінований засіб для усунення симптомів алкогольної інтоксикації» МПК (2021.01) A61K 31/223, A61K 31/616, A61K 31/223, A61K 31/375, A61K 9/14, A61P 25/32 / О. В. Рудакова, С. М. Губарь, О. М. Безчаснюк, Д. В. Литкін, Н. М. Смєлова, В. А. Георгіянц (27.06.2022 р. зареєстровано клопотання про проведення кваліфікаційної експертизи на винахід).

Результати дисертаційних досліджень упроваджено в навчальний процес низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю України.

Ключові слова: порошок шипучий, алкогольна інтоксикація, гліцин, глютамінова кислота, аскорбінова кислота, ацетилсаліцилова кислота, технологія, стабільність, стандартизація.

Список публікацій здобувача:

1. Rudakova O., Gubar, S., Smielova N., Yaremenko M., Bevz N., Georgiyants V. Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 2 (36). P. 81–89. (Scopus). DOI: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.25585> (Особистий внесок: участь в зборі даних, аналізі та інтерпретації результатів експерименту, оформлення та підготовка статті до друку).
2. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Lytkin D., Briukhanova T., Bezchasnyuk E., Bevz N., Georgiyants V. Study of compatibility of components of a new combined drug for treatment of alcoholic intoxication and its hepatoprotective effect on a model of alcoholic liver injury. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 6 (34). P. 91–100. (Scopus) DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.249880> (Особистий внесок: участь в зборі даних, статистичному аналізі, інтерпретації результатів експерименту та підготовці статті).
3. Rudakova O. V., Gubar S. M., Bezchasnyuk O. M., Bevz N. Y., Smielova N. M., Georgiyants V. A. Розробка складу та технології комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 1. С. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721> (Особистий внесок: участь в обговоренні, узагальненні результатів експерименту, оформлення та підготовка статті до друку).
4. Rudakova O. V., Gubar S. M., Smielova N. M., Kriukova A. I., Bevz N. Y., and Georgiyants V. A. The selection of ‘Green’ conditions for components identification in a combined medicine by TLC/HPTLC Methods. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 2. P. 52–63. DOI: <http://ophcj.nuph.edu.ua/article/view/259691> (Особистий внесок: участь в аналізі літературних джерел, проведено частину експериментального дослідження, підготовка статті до публікації).
5. Rudakova O., Gubar S., Kriukova, A., Smielova N., Bezchasnyuk E. Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycine. *ScienceRise:*

Pharmaceutical Science. 2019. № 5 (21). P. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294> (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, проведенні дослідження, обробці одержаних даних, оформлення та підготовка статті до друку).

6. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Рудакова О. В. Визначення стратегії та підходів фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи*: матеріали II Всеукр. наук. конф., м. Житомир, 16 трав. 2018 р. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. І. Франка 2018. С. 223–225.

7. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Смєлова Н. М., Рудакова О. В. Вивчення сумісності компонентів на етапі фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Управління якістю в фармації*: матеріали XII наук.-практ. конф., м. Харків, 18 трав. 2018 р. Х. : НФаУ, 2018. С. 50–51.

8. Rudakova O., Gubar S., Bezchasnyuk O., Georgiyants V. Justification for choosing a dosage form of a combined original pharmaceutical preparation. *Science and practice 2018: abstracts of 9th International Pharmaceutical Conference*, Kaunas, November 09, Lithuania. 2018. P. 102.

9. Губарь С. Н., Рудакова О. В., Безчаснюк Е. М., Георгиянц В. А. Обоснование выбора аминокислот и их стандартизация в оригинальном лекарственном средстве антиалкогольного действия. *Роль и место инновационных технологий в современной медицине*: материалы 66-ой годичной науч.-практ. конф. с междунар. уч. ТГМУ им. Абуали ибни Сино, г. Душанбе, 23 нояб. 2018. Т. 2. С. 356–357.

10. Рудакова О. В., Губарь С. М., Крюкова А. І., Смєлова Н. М., Безчаснюк О. М. Обґрунтування вибору тіоктової кислоти та її стандартизація в оригінальному лікарському засобі антиалкогольної дії. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського*: матеріали підсумк. LXII наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 13 черв. 2019. Тернопіль : ТНМУ, 2019. С. 96–97.

11. Rudakova O., Gubar S., Kriukova A., Smielova N., Yaremenko M. Development and validation of glycine standardization technique in the new combination drug with the antialcohol effect. *Science and practice 2019* : abstracts of 10th International Pharmaceutical Conference, Kaunas, November 15, Lithuania. 2019. P. 44.

12. Rudakova O., Gubar S., Yaremenko M., Smielova N., Georgiyants V. The development and validation of the assay technique for ascorbic and acetylsalicylic acids in a combination medicinal product by HPLC. *Хімічні Каразінські читання – 2020* : XII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 21 – 23 квіт. 2020 р., Харків, 2020. С. 23–24.

13. Підбір «зеленої» рухомої фази для ефективного розділення глютамінової кислоти та гліцину у комбінованому лікарському засобі методом ТШХ / О. В. Рудакова, С. М. Губарь, Н. М. Смієлова, Н. Ю. Бевз, А. І. Крюкова, В. А. Георгіянц. *Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво* : VI Міжнар. наук.-практ. конф., м. Шостка, 23 – 25 лист. 2022 р. м. Суми : Сумський державний університет, 2022. С. 235–239.

ANNOTATION

Rudakova O. V. Development and standardization of a combined medicine for pharmacological correction of alcohol intoxication. – Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

The thesis for obtaining the scientific degree of Philosophy Doctor in specialty 226 “Pharmacy, industrial pharmacy” (22 – Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis offers theoretical and experimental substantiation of the composition, technology and quality control methods of the combined dosage form in the form of an effervescent powder for oral use with the purpose of pharmacological correction of alcohol intoxication.

The *first* chapter summarizes literature data on biochemical transformations that occur in the human body during alcohol poisoning, and pharmacotherapy to eliminate these unwanted effects. It was defined that the complex of symptoms of alcohol

intoxication includes acute headache, drowsiness, weakness, nausea, sometimes with vomiting, depressed mood, hand tremors, impaired concentration, which arise as a result of the toxic effect of alcohols or the products of their metabolism on the human body. The analysis of the pharmaceutical market of medicines, used for reducing the symptoms of alcohol intoxication, proved that the effectiveness of most medicines depends on the content of active pharmaceutical ingredients (APIs), which most often affect individual components of the pathogenesis of the pathology.

The *second* chapter is devoted to the characteristic of APIs and excipients chosen for dosage form production. The methods of pharmacotechnological, physico-chemical, pharmacological and microbiological studies, used during the development of the optimal composition and rational technology of powders for oral use, are given. For the development of quality control techniques, modern methods of analysis were chosen, including absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet regions (spectrophotometry), thin-layer chromatography (TLC), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), semi-micro method of water estimation (K. Fisher method), etc.

In the *third* chapter, taking into consideration the modern market and properties of substances, the choice of APIs was made in order to create a combined medicine for pharmacological correction of alcohol intoxication. L-glutamic acid was selected – a component of the Krebs cycle, which improves the energy supply of cells and is necessary for neutralizing and removing ammonia, accumulated in the body during alcohol intoxication; acetylsalicylic acid as a means of relieving pain syndrome; ascorbic acid – to ensure the anti-stress effect of the product; glycine – for neutralizing toxic products of the breakdown of ethyl alcohol, in particular, acetaldehyde, and reducing psycho-emotional tension and aggressiveness, improving mood, mental performance and normalizing sleep.

In the process of developing a new combined medicine, one of the first stages includes the study of API properties. For faster absorption of the medicine, it was suggested adding citric acid to the composition of the medicinal product, and using sodium bicarbonate to create an effervescent drink, neutralize gastric acid, reduce the

damaging effect of acids on the gastric mucosa, eliminate metabolic acidosis and equalize the acid-alkaline balance in the body, for taste correction it is advisable to use carbohydrates.

For estimation of the compatibility of the mixture components, experimental studies of hygroscopicity, chemical interaction / chemical stability and determination of redox potential were carried out. The experimental studies of hygroscopicity indicate that glutamic acid, ascorbic acid and sodium hydrogen carbonate can be attributed to non-hygroscopic substances (the average value of mass increase is less than 0.1 %); glycine and acetylsalicylic acid – to slightly hygroscopic (the increase in mass is from 0.2 % to less than 2 %); sorbitol, anhydrous lactose – to hygroscopic (increase in mass is from 2 % to less than 15 %), and fructose can be considered as a substance that dissolves in moisture absorbed from the air.

As a result of defining the chemical interaction of components by the spectrophotometry method in an aqueous and alkaline environment, it was found that the most likely was the effect of an alkaline environment on acetylsalicylic and ascorbic acids, manifested more significantly in the presence of moisture.

While choosing taste correctors, for comparison, such carbohydrates as fructose, sucrose, glucose or sorbitol were used and their chemical compatibility with amino acids was checked. It was experimentally proven that using only sorbitol was not enough for sugaramine condensation reaction (Maillard reaction). Checking the chemical compatibility of ascorbic acid with amino acids, it was found out that glycine was a neutral amino acid capable of interacting with vitamin C; glutamic acid, as a dibasic acid, did not show the ability to interact.

To avoid the possibility of oxidation of the active components of the composition with air oxygen, the redox potentials of the compounds were studied and it was found out that the most labile substance for the oxidation process in the mixture is ascorbic acid, which can interact with glycine under certain conditions. Given the fact that the reducing component of medicine (ascorbic acid) can be oxidized by air oxygen, and the mediator of this process can be an alkaline medium (sodium bicarbonate), it was decided to separate the alkaline component from other APIs.

According to the results of the studies it was agreed to separate APIs into 2 packages and separate sodium bicarbonate and glycine, which can interact with ascorbic and acetylsalicylic acids, respectively.

Taking into consideration the significant degree of hygroscopicity of some powder constituents (sorbitol, citric acid) and the ability to enter into chemical reactions in the presence of an excess amount of moisture (citric acid), Buflen was chosen as the material for the primary packaging of the obtained powder.

It was identified that the amount of sorbitol, citric acid and sodium bicarbonate affects the change in the taste of the medicine for the pharmacotherapy of alcohol intoxication. In order to determine the organoleptic evaluation of the proposed medicine, it was compared with medicines for the treatment of alcohol intoxication available on the pharmaceutical market: Medichronal® (Pharmaceutical Company “Darnitsa”, Ukraine), Alka-Seltzer (Bayer Consumer Care AG, Germany), Glutargin alkoklin (Pharmaceutical company «Zdorovye», Ukraine), Alka-Prim® (Pharmaceutical Works “Polpharma” S.A., Poland).

The conducted research made it possible to choose a rational composition of a combined medicines for the pharmacological correction of alcohol intoxication in the form of an effervescent powder for the preparation of an oral solution (with the distribution of the API mixture into two sachets, weighing 4000 mg each) under the conditional name "Aminoacetasc".

The results of the study of the technological properties (bulk mass, bulk volume, fluidity) of the experimental mixtures of package No. 1 and package No. 2 using the declared substances indicate getting the kinds of powder with the specified quality indicators, which will ensure uniformity of packaging. The chosen method of the direct powder mixing, which allows to reduce the risk of violation of the homogeneity of the of active substances content, is economical and decreases labor costs during the manufacture of a combined medicine in the form of an effervescent powder to eliminate the symptoms of alcohol intoxication. The main stages were determined and the critical parameters of the technological process were developed. In accordance with the obtained results the resource-saving medicine production technology was developed.

As a result of carrying out pharmacological studies of the selected composition of the powder it was proved that the suggested medicine shows statistically significant activity on models of alcoholic hepatitis and single alcohol intoxication, which is not worse but even exceeds modern commercial products for pharmacocorrection of hangover syndrome. In the reproduction of the experimental model of alcoholic hepatitis, the studied test sample in a daily dose of 1.24 g/kg for intragastric administration in a therapeutic and preventive regimen for 30 days led to a probable decrease in the activity of alanine aminotransferase in the blood serum by 33.6 %, a decrease in the content of TBARS-products by 26.4 % and an increase in the content of reduced glutathione by 36.0 % compared to the control pathology. In the reproduction of the acute ethanol intoxication of a moderate severity, the tested sample at a dose of 1.24 g/kg for a single administration led to a probable increase in the sum of behavioral activities in rats in the “open field” test on the day of intoxication by 47.3 %, and for repeated administration a day later – by 36.6 % against the negative control.

It was proved that the composition of the suggested combined medicine was optimal as the decrease of the components mass did not provide an adequate level of medicine pharmacological activity. The increase of the components mass up to the most possible therapeutic dose is impractical due to the stabilization of the therapeutic effect, the level of which does not change significantly in the case of an increase in the active substances, and therefore leads to an increase in the cost of the medicine.

In the *fourth* chapter the standardization stages of the combined effervescent powder for preparing the solution for oral use, which was carried out in accordance with the requirements of the general articles of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) “Liquid preparations for oral use” (Praeparationes liquidae perorales) and “Powders, oral” (Pulveres perorales). Such quality indicators as description, identification, mass homogeneity, dosage units homogeneity, accompanying impurities, loss in mass during drying, microbiological purity and quantitative determination were introduced into the specification of the medicine “ Powders, oral”.

An ecological TLC/HPTLC technique was developed for the simultaneous identification of glycine and glutamic acid, which allows to identify not only amino acids,

but also ascorbic acid. The technique lies in chromatography of solutions of the studied compounds in the mobile phase of *ethanol* (96 %) – *water* (70:30) and detection of chromatographic zones with a solution of *ninhydrin R1* at a temperature of 105 °C. Validation characteristics of the technique were studied: specificity, robustness and precision. Determination of the limit content of amino acid impurities – substances that can be reduced by ninhydrin was carried out; it was established that their content does not exceed the norm of 0.5 %.

Sorbitol was identified in the combined medicine by the TLC method according to the unified technique in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia and the SPU.

A unified approach to the identification, quantitative determination of ascorbic and acetylsalicylic acids and accompanying impurities (salicylic acid) by the method of HPLC was developed for the first time. The optimal chromatographic conditions were selected, taking into account the influence of other APIs and excipients of the medicine, consisting in the use of a column 150 × 4.6 mm filled with aminopropylsilyl *silica gel for chromatography R* (Supelcosil LC-NH₂ produced by «Supelco»), with a pre-column (particle size 3 µm) and eluted in the mobile phase pH 3.2 buffer solution – *acetonitrile R* (80:20) in isocratic mode (mobile phase speed was 1.2 ml/min; column temperature – 45 °C; injection volume – 20 µl, chromatography time – 10 min). The substances were detected with a UV detector at a wavelength of 240 nm. An effective chromatographic separation of ascorbic, acetylsalicylic and salicylic acids was achieved. To prove the possibility of using the proposed technique in the further analysis of effervescent powder, its validation was carried out by the "introduced-detected" method. As a result of validation technique for quantitative determination of such parameters as specificity, linearity, precision, correctness, intra-laboratory accuracy, robustness, it was found out that the obtained values do not exceed the set acceptance criteria and the technique is suitable for the analysis.

Physico-chemical methods of analysis were used for the quantitative determination of the mixture components, in particular for glycine and glutamic acid – practices and techniques of the spectrophotometry method, based on the reaction of the formation of a

colored product with an alcoholic solution of ninhydrin. It was concluded that the reaction between amino acids and ninhydrin took place within 30 minutes in a boiling water bath, with the addition of different amounts of a buffer solution with a pH of 6.8, depending on the contents of the package. To increase stability, it is advisable to carry out the reaction of the interaction of glycine with ninhydrin with the addition of ascorbic acid. The main validation characteristics – robustness, linearity, correctness, precision – confirm the possibility of using these techniques in the presence of other components of combined powders and for conducting quality control of the studied dosage form throughout the whole “life cycle”.

The “Uniformity of dosage units” test was conducted for all the active substances of the medicine “Powders, oral” in accordance with the requirements of the SPU using the direct determination method. It was found out that the acceptance number AV for the first 10 packages №1 $L1 \leq 15$ for acetylsalicylic acid, ascorbic acid, glycine and glutamic acid.

The results of studying the microbiological purity of packages No. 1 and 2 “The combined medicine for the elimination of the symptoms of alcohol intoxication” at the time of their manufacture and during storage prove the compliance of the microbiological purity of the medicine with the requirements of the SPU for 24 months (2 years) of storage.

Chemical stability of the combined effervescent powder for the elimination of the symptoms of alcohol intoxication in packages No. 1 and 2 from the material for pharmaceutical preparations (Buflen) was studied according to the specifications of the developed project of quality control methods (QCM) during storage at a temperature of $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ and a relative humidity of $(60 \pm 5) \%$. During the entire period of observation, which was 24 months, the experimental samples of package № 1 and package № 2 had minor deviations from the initial indicators and met the requirements of the QCM project.

In accordance with the results of the conducted research, an application for a patent of Ukraine for the invention No. a202200153 dated 17.01.22 “The combined medicine for the elimination of the symptoms of alcohol intoxication” IPC (2021.01) A61K 31/223, A61K 31/616, A61K 31/223, A61K 31/375, A61K 9/14, A61P 25/32 / O. V. Rudakova,

S. M. Gubar, O. M. Bezchasnyuk, D. V. Lytkin, N. M. Smielova, V. A. Georgiyants was submitted (the decision to conduct a qualification examination for the invention was received on 02.08.2022).

The results of the thesis research have been included into the educational process of a number of Ukrainian higher educational establishments of pharmaceutical (medical) profile.

Key words: effervescent powder, alcohol intoxication, glycine, glutamic acid, ascorbic acid, acetylsalicylic acid, technology, stability, standardization.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ I	29
ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ, НАПРЯМИ СУЧАСНОЇ ФАРМАКОТЕРАПІЇ	29
1.1 Аналіз фармацевтичного ринку лікарських засобів, застосовуваних у разі алкогольної залежності.....	29
1.2 Епідеміологія споживання алкогольних напоїв	33
1.3 Наслідки зловживання алкоголем	34
1.4 Біохімічні механізми патогенезу алкогольної інтоксикації.....	35
1.4.1 Порушення нейротрансмісії у ЦНС.....	35
1.4.2 Алкогольна хвороба печінки.....	37
1.4.3 Окисний стрес	40
1.4.4 Дефіцит енергії та енергетичних субстратів	41
1.5 Фармакологічна та нефармакологічна корекція похмільного синдрому	43
Висновки до розділу I.....	47
РОЗДІЛ II.....	49
ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
2.1 Характеристика АФІ та допоміжних речовин як об'єктів дослідження.....	49
2.1.1 Активні фармацевтичні інгредієнти	50
2.1.2 Допоміжні речовини.....	52
2.2 Відомості про прилади, обладнання, стандартні зразки, розчинники та реактиви.....	55
2.3 Методи дослідження.....	58
2.3.1 Фізичні, фізико-хімічні методи дослідження, фармакотехнологічні випробування	58
2.3.2 Біологічні методи аналізу	74
2.3.3 Статистичний аналіз результатів експерименту	79
2.3.4 Валідація аналітичних методик і випробувань	80
2.3.5 Оцінка екологічності аналітичних процедур	80
Висновки до розділу II.....	81
РОЗДІЛ III.....	83
РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ КОМБІНОВАНОГО ОРИГІНАЛЬНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СИМПТОМІВ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ВИВЧЕННЯ ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ	83
3.1 Обґрунтування вибору АФІ для введення у фармакологічний засіб з огляду на симптоми алкогольної інтоксикації	84
3.2 Експериментальні дослідження сумісності компонентів композиції	86
3.3 Оптимізація технології комбінованого фармакологічного засобу у формі порошку шипучого для орального розчину	92

3.4 Дослідження гепатопротекторного ефекту нового фармакологічного засобу на моделі алкогольного ураження печінки в щурів	103
3.5 Дослідження впливу тест-зразка на поведінкові реакції після одноразового введення етанолу	106
Висновки до розділу III	111
РОЗДІЛ IV	113
СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ КОМБІНОВАНОГО ОРИГІНАЛЬНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ	113
4.1 Ідентифікація активних фармацевтичних інгредієнтів комбінованого оригінального лікарського засобу.....	114
4.1.1 Підбір «зелених» умов для ідентифікації амінокислот у комбінованому лікарському засобі методом ТШХ/ВЕТШХ.....	114
4.1.2 Вивчення валідаційних характеристик ТШХ-методики ідентифікації амінокислот і аскорбінової кислоти. Підбір умов для визначення на ВЕТШХ-пластині.....	123
4.1.3 Розробка методик ідентифікації ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот при сумісній присутності	131
4.1.4 Ідентифікація сорбіту методом ТШХ.....	134
4.2 Визначення супровідних домішок	135
4.2.1 Визначення граничного вмісту домішок амінокислот методом ТШХ ..	136
4.2.2 Визначення граничного вмісту домішки саліцилової кислоти методом ВЕРХ	137
4.3 Кількісне визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у порошку шипучому для приготування розчину для орального застосування.....	141
4.3.1 Кількісне визначення ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот методом ВЕРХ	141
4.3.2 Кількісне визначення гліцину методом спектрофотометрії.....	144
4.3.3 Кількісне визначення глютамінової кислоти методом спектрофотометрії	153
4.4 Дослідження стабільності лікарського засобу	163
Висновки до розділу IV	165
ВИСНОВКИ	167
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	170
ДОДАТКИ	187

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АК – аскорбінова кислота

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АСГ – алкогольний стеатогепатит

АСК – ацетилсаліцилова кислота

АТФ – аденозинтрифосфат, або аденозинтрифосфорна кислота

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

АХП – алкогольна хвороба печінки

ВГ – відновлений глутатіон

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГАМК – γ -аміномасляна кислота

ГК – глутамінова кислота

ДФУ – Державна фармакопея України

ЄФ – Європейська фармакопея

ІК – інтактний контроль

КП – контрольна патологія

ЛЗ – лікарський засіб

ЛК – лимонна кислота

ЛПДНЩ – ліпопротеїни дуже низької щільності

ЛФ – лікарська форма

МКЯ – методи контролю якості

НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НД – нормативна документація

НК – негативний контроль

ННТЛМБД – Навчально-наукова тренінгова лабораторія медико-біологічних досліджень

НПЗЗ – нестероїдний протизапальний засіб

НФаУ – Національний фармацевтичний університет

ОВР – окисно-відновна реакція

ПОЛ/АОС – перекісне окиснення ліпідів / антиоксидантної системи

РЗ-ГА – референтна група (Глутаргін Алкоклін)

РЗ-МД – референтна група (Медихронал®-Дарниця)

РП-1, РП-2, РП-3, РП-4 – розчини порівняння у методі ТШХ

СЗ – стандартний зразок

США – Сполучені Штати Америки

ТАГ – триацилгліцероли

ТБК-АП – ТБК-активний продукт

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЦНС – центральна нервова система

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

AUD – alcohol use disorder; алкогольний розлад

AWS – alcohol withdrawal syndrome; алкогольний абстинентний синдром

DSM-V – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; Діагностичний і статистичний посібник із психічних розладів

EP CRS – European Pharmacopoeia Reference Standard; стандартний зразок Європейської фармакопеї

NMDA-рецептори – іонотропний рецептор глутамату, що селективно зв'язує N-метил-D-аспартат

PPAR α – peroxysome proliferator-activated receptors; рецептори, що активуються пероксисомними проліфераторами

NMDA-рецептори – іонотропний рецептор глутамату, що селективно зв'язує N-метил-D-аспартат.

SAM – S-аденозилметіонін

TAMC – загальне число аеробних мікроорганізмів

TYMC – загальне число дріжджових та плісневих грибів

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

З алкоголем пов'язують розвиток ряду серцево-судинних захворювань, захворювань шлунково-кишкового тракту (цироз печінки), нервової системи, а також деяких видів злоякісних пухлин і різних видів раку, психічні та поведінкові розлади, включно з алкогольною залежністю, травми, нещасні випадки і розлади здоров'я плода і новонароджених.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у всьому світі щороку 3 мільйони смертей є наслідком шкідливого вживання алкоголю (5,3 % усіх смертей). У світі алкоголь щорічно призводить до смерті майже одного мільйона людей – близько 12 % усіх випадків смерті серед чоловіків та 8% – серед жінок. Державний комітет статистики України за підсумками 2022 року інформує, що випадки смертей від розладів психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю – 46 чол (0,08 %), а кількість летальних випадків внаслідок алкогольної кардіоміопатії – 379 випадків (0,66 %). Кількість смертей від алкогольної хвороби печінки (цироз) – 173 випадки (0,30 %).

ВООЗ наголошує на необхідності розробки, впровадженні та оцінці економічно ефективних протоколів лікування щодо шкідливого вживання алкоголю, а також створенні, збиранні та поширенні наукової інформації про вживання алкоголю та залежність, а також пов'язані з цим наслідки для здоров'я та соціальні наслідки.

Значні показники поширеності та летальності при вживанні алкоголю формують потребу в забезпеченні дієвими практичними рекомендаціями з питань лікування отруєнь етанолом та надмірного вживання алкоголю спеціалістів на догоспітальному етапі та фармацевтів при наданні фармацевтичної опіки. Тому розробка та впровадження в практику якісних, ефективних, безпечних та доступних лікарських засобів з доведеною терапевтичною ефективністю в значній мірі забезпечить гарантоване надання якісної та своєчасної медичної допомоги постраждалим внаслідок гострих отруєнь етанолом, пацієнтам, які зловживають

алкоголем на рівні «побутового пияцтва», та водночас дозволить знизити рівень захворюваності алкоголізмом.

У зв'язку з цим доцільно проведення досліджень, спрямованих на розширення асортименту препаратів, що надають детоксикаційну дію та сприяють зняттю симптомів отруєння після застосування напоїв, що містять етанол.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційну роботу виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету (НФаУ) «Розробка нових і удосконалення існуючих методів аналізу лікарських засобів для виявлення субстандартної та фальсифікованої продукції» (№ державної реєстрації 0114U000952), «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного і промислового виробництва» (№ державної реєстрації 0114U000949).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є розробка складу, технології та методів контролю якості (МКЯ) нового оригінального лікарського засобу (ЛЗ) для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації.

Для досягнення визначеної мети необхідно було розв'язати такі завдання:

- проаналізувати дані літератури з питань епідеміології, біохімічних механізмів патогенезу алкогольної інтоксикації та фармакологічної і нефармакологічної корекції похмільного синдрому;
- виконати маркетингове дослідження фармацевтичного ринку України щодо забезпечення ЛЗ, застосовуваних для лікування алкогольної залежності;
- запропонувати методологічні підходи до виробництва та контролю якості препаратів у формі порошку шипучого для приготування орального розчину;
- обґрунтувати вибір активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та допоміжних речовин для створення лікарської форми (ЛФ) у вигляді порошку шипучого для приготування орального розчину;
- виконати структурно-механічні дослідження ЛФ з урахуванням фізико-хімічних властивостей АФІ та допоміжних речовин;

- запропонувати оптимальний склад ЛФ з огляду на результати вивчення фармакологічних і фізико-хімічних властивостей обраних компонентів;
- запропонувати технологію виготовлення ЛФ;
- розробити специфічні методики ідентифікації та кількісного визначення складових комбінованого препарату;
- дослідити вплив умов зберігання на стабільність розробленого ЛЗ.

Об'єкт дослідження: АФІ – гліцин, глютамінова кислота, ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота; допоміжні речовини – лимонна кислота, натрію гідрокарбонат, сорбіт. Експериментальне обґрунтування складу, технології, методик контролю якості порошку шипучого для приготування орального розчину; дослідження фармакотехнологічних властивостей; визначення умов зберігання і терміну придатності; дослідження фармакологічної активності; розроблення схеми технологічного виготовлення та проекту МКЯ.

Предмет дослідження: науково і фармакологічно обґрунтований склад і раціональна технологія виготовлення комбінованого оригінального ЛЗ для фармакотерапії алкогольної інтоксикації, специфікаційні характеристики та стандартизація ЛФ.

Методи дослідження

Для розв'язання науково-практичних завдань було використано: фізико-хімічні методи дослідження – високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), тонкошарова хроматографія (ТШХ), абсорбційна спектрофотометрія в УФ- та видимій ділянках (спектрофотометрія), метод К. Фішера для визначення залишкової кількості води, визначення втрати в масі під час висушування, потенціометричне визначення рН, визначення ступеня гігроскопічності; мікробіологічні методи дослідження; фармакотехнологічні випробування: плинність, насипний об'єм, насипна маса. Фармакологічні дослідження виконували на моделях *in vivo*. Дані обробляли методом математичної статистики згідно з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ) за допомогою програм Statistica (StatSoft, USA) та Excel (Microsoft, USA).

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше на підставі фізико-хімічних, біофармацевтичних і фармакологічних досліджень обґрунтовано склад і розроблено ресурсозберігальну технологію промислового виробництва ЛФ для усунення симптомів алкогольної інтоксикації.

Запропоновано методики ідентифікації і кількісного визначення АФІ у багатокомпонентному препараті, визначено супровідні домішки. Визначено основні показники якості розробленого препарату, а також оптимальні умови його зберігання і термін придатності.

У процесі виконання дисертаційної роботи розроблено екологічну ТШХ/ВЕТШХ-методику ідентифікації гліцину, глутамінової та аскорбінової кислот, вивчено її валідаційні характеристики. Для одночасної ідентифікації і кількісного визначення суміші ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот та визначення вмісту супровідних домішок дібрано умови аналізу методом ВЕРХ та проведено їх валідацію.

За результатами виконаних досліджень подано заявку на патент України на винахід № а202200153 від 17.01.22 р. «Комбінований засіб для усунення симптомів алкогольної інтоксикації» (27.06.2022 р. отримано рішення про проведення кваліфікаційної експертизи на винахід).

Практичне значення отриманих результатів

На підставі фармакологічних досліджень було розроблено й запропоновано комбінований засіб у формі порошку шипучого для приготування орального розчину (пакет № 1 та пакет № 2) з метою використання у практичній медицині для усунення симптомів алкогольної інтоксикації.

Розроблено проєкт методів контролю якості, що містить опис методик ідентифікації, випробувань та кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів та фармакотехнологічних випробувань. Запропоновано технологічну схему виробництва лікарського засобу та визначені критичні параметри технологічного процесу.

Розроблені та валідовані хроматографічні методики ідентифікації, кількісного визначення АФІ, методики визначення вмісту супровідних домішок

для комбінованого лікарського засобу можуть бути впроваджені в практичну діяльність вітчизняних фармацевтичних підприємств і науково-дослідних лабораторій із контролю якості ЛЗ.

Фрагменти роботи впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження від 15.09.2022 р.); кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 19.07.2022 р.); кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 27.01.2022 р.); кафедри фармацевтичних дисциплін ДВНЗ «Ужгородський національний університет (акт впровадження від 04.10.2022 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Безпосередньо автором здійснено інформаційний пошук та узагальнено дані літературних джерел із досліджуваної тематики. На підставі теоретичних даних та експериментальних досліджень особисто автором розроблено склад, технологію та проєкт МКЯ комбінованого лікарського засобу у формі порошку шипучого для приготування орального розчину (пакет № 1 та пакет № 2) для фармакологічної корекції симптомів алкогольної інтоксикації. Результати експериментальних досліджень статистично оброблено, а висновки систематизовано. Персональний внесок дисертантки в усіх опублікованих працях зі співавторами (В. А. Георгіянц, С. М. Губарь, Н. Ю. Бевз, О. М. Безчаснюк, Н. М. Смєловою, А. І. Крюковою, М. С. Яременко, Д. В. Литкіним, Т. О. Брюхановою) зазначено у тексті дисертації.

Визначення цілей, шляхів їх реалізації, обговорення результатів отриманих даних виконано разом із науковим керівником.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи викладено й обговорено на: II Всеукраїнській науковій конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, 2018); XII науково-практичній конференції «Управління

якістю в фармації» (Харків, 2018); 9th International Pharmaceutical conference «Science and practice 2018» (Kaunas, Lithuania, 2018); 66-ой годичной научно-практической конференции с международным участием ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Роль и место инновационных технологий в современной медицине» (Душанбе, Таджикистан, 2018); LXII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвяченої 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського (Тернопіль, 2019), VI Міжнародній науково-практичній конференції «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво» (Шостка, 2022).

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота, викладена на 214 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту складає 151 сторінка друкованого тексту. Роботу ілюстровано 36 таблицями та 41 рисунком. Список використаних джерел містить 174 найменування, з них 22 кирилицею та 152 латиницею.

РОЗДІЛ I

ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ, НАПРЯМИ СУЧАСНОЇ ФАРМАКОТЕРАПІЇ

(Огляд літератури)

Гостра алкогольна інтоксикація (отруєння) – це стан, який виникає внаслідок вживання надмірної кількості алкогольних напоїв у людини, яка не страждає алкоголізмом. Алкогольна інтоксикація характеризується комплексом симптомів, серед яких гострий головний біль, сонливість, слабкість, нудота (іноді з блювотою), пригнічений настрій, тремор рук, порушення концентрації уваги, які виникають внаслідок токсичної дії спиртів або продуктів їх метаболізму на організм людини [37, 38, 47].

1.1 Аналіз фармацевтичного ринку лікарських засобів, застосовуваних у разі алкогольної залежності

Засоби для призупинення алкогольного похмільного синдрому та засоби для терапії алкогольного абстинентного синдрому й алкоголізму диференціюють за діагнозом. По-перше, ці патологічні стани належать до різних діагнозів за міжнародним класифікатором хвороб: *P 10.1 Згубне для здоров'я вживання* та *P 10.2 Синдром залежності + P 10.3 Абстиненція* відповідно [14]. Зазвичай похмільний синдром є наслідком епізодичного надмірного вживання алкоголю та захисною реакцією організму на потрапляння всередину умовного токсиканту у великій кількості, а сам стан похмілля не триває більше доби, для полегшення загального стану пацієнта в такому випадку доцільно застосовувати ОТС-препарати та здебільшого обмежуватися лише наданням допомоги через фармацевтичну опіку [166]. З іншого боку, фармакотерапія алкоголізму й алкогольної абстиненції потребує серйозного тривалого лікування (зазвичай стаціонарного) із використанням фармакотерапевтичних і психолого-

психіатричних методів допомоги пацієнтові, а препарати, використовувані в такому випадку, є переважно рецептурними [106].

На сучасному фармацевтичному ринку України, засоби, в інструкціях до застосування яких міститься інформація щодо їх використання у терапії абстинентного синдрому та алкогольної інтоксикацій, представлені як ЛЗ, так і дієтичними добавками (табл. Додаток А.1-А.2, рис. 1.1).



Рис. 1.1 Кількість ЛЗ та дієтичних добавок, застосовуваних для лікування абстинентного синдрому та усунення алкогольної інтоксикацій, які присутні на сучасному фармацевтичному ринку України (станом на 2020 рік)

Незначна кількість сучасних ЛЗ, які є фармакокоректорами похмільного синдрому, представлені комбінованими засобами (9 %) (рис. 1.2) [12].

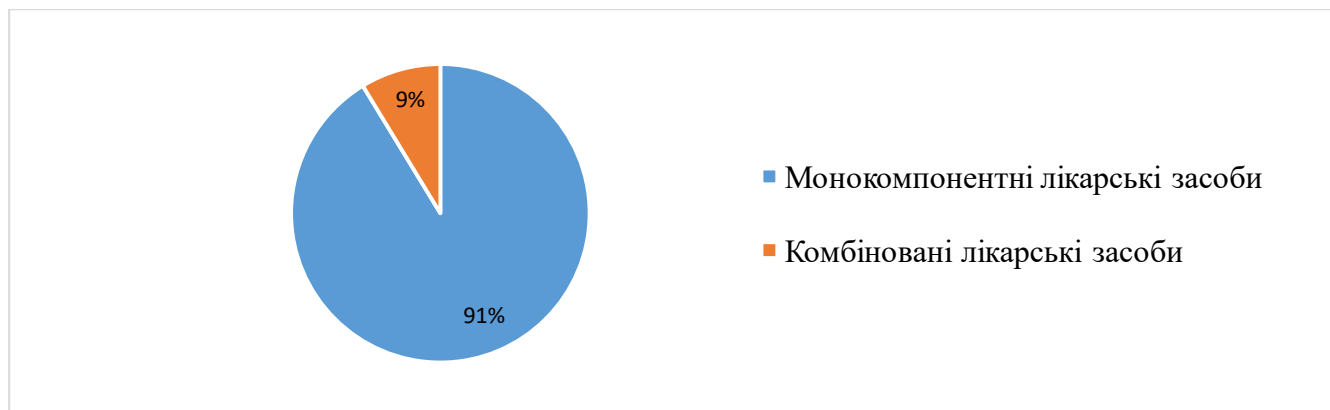


Рис. 1.2 Розподіл ЛЗ за кількісним складом

За типом лікарської форми найбільшу кількість представляють собою ЛЗ у вигляді розчинів для ін'єкцій (44 %) та таблетки (40 %) (рис. 1.3).

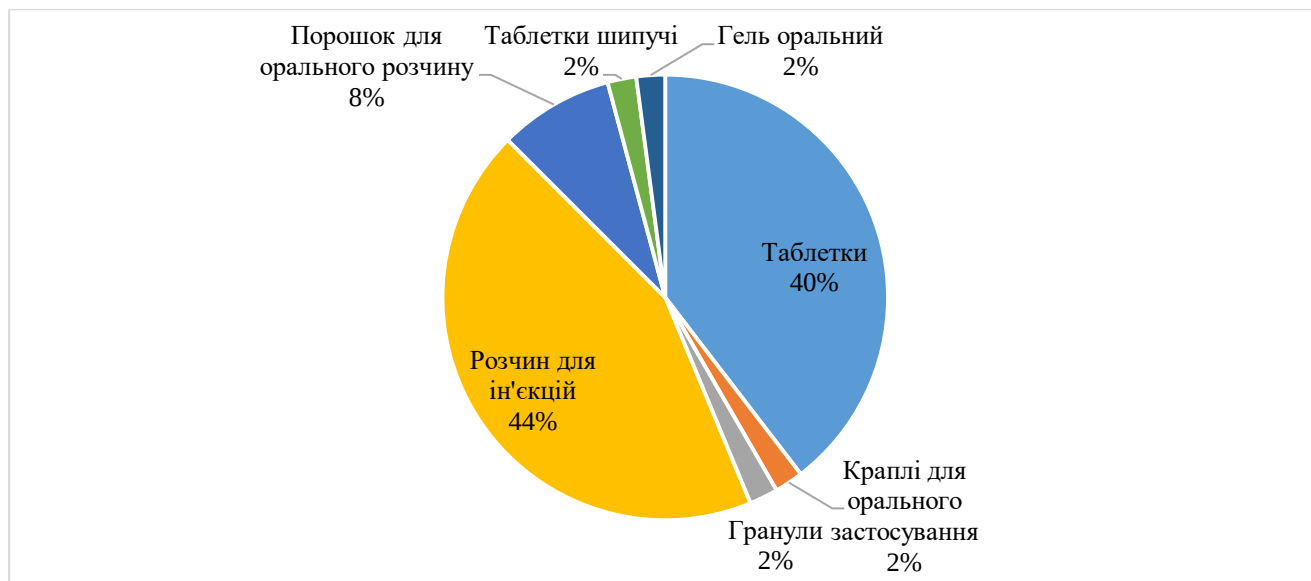


Рис. 1.3 Частка лікарських засобів в залежності від лікарської форми

Комбіновані ЛЗ (Ліверія®IC, Медихронал®-Дарниця, Біотредин тощо) належать до групи N07B В «Засоби, що застосовуються при алкогольній залежності» за АТС-класифікацією і знаходяться в одному ряду з такими сильнодіяними засобами, як ціанамід, дисульфірам та налтрексон. Взагалі засоби, що знімають похмільний синдром, можна застосовувати і для вторинної профілактики або в комбінованій терапії алкогольної залежності, проте, як вже було зазначено, лікування похмілля та алкоголізму необхідно розрізняти. Також деякі ЛЗ, рекомендовані для зняття похмільного синдрому, належать до групи A05B А «Гепатотропні препарати» (Глутаргін, Глутаргін Алкоклін, Аргінін-Дарниця тощо) та до групи N02B А «Саліцилова кислота та її похідні» (Алка-Зельтцер, Алька-Прим® тощо).

Попри те, що ці групи містять у своєму складі багато різноманітних ЛЗ, на жаль, небагато з них зазначають алкогольну інтоксикацію, алкогольне похмілля або його окремі симптоми в показаннях до застосування, а деякі засоби на основі ацетилсаліцилової кислоти на момент проведення експерименту втратили чинну реєстрацію та були відсутні в аптеках. З іншого боку, певні ЛЗ, що їх потенційно

могли б застосовувати для лікування симптомів саме алкогольного похмільного синдрому, не містять цієї інформації в інструкції до застосування, що знижує комплаєнс пацієнтів [12, 37, 47].

Однак згідно з сучасними рекомендаціями із надання фармацевтичної опіки в разі похмільного синдрому використовують наступні групи ЛЗ [106, 123, 166]:

- нестероїдні протизапальні засоби, НПЗЗ (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, напроксен тощо), що застосовують як симптоматичну терапію в разі головного та м'язового болю, а також для запобігання деяким побічним ефектам етанолу [106, 166];

- вітаміни (вітаміни групи В, вітамін С), що застосовують як антиоксиданти. Ця група ЛЗ поповнює дефіцит водорозчинних вітамінів, кількість яких зменшується через посилений діурез та інтенсивне залучення певних коферментів до реакцій метаболізації алкоголю [123];

- похідні L-амінокислот (S-аденозилметіонін, N-ацетилцистеїн, аргінін, орнітин, гліцин, глутамінова кислота, аспарагінова кислота тощо), що застосовують як гепатопротектори (бо виявляють детоксикаційну дію для печінки шляхом пришвидшення орнітинового циклу або шляхом залучення до процесів синтезу і відновлення глутатіону), поставати важливими учасниками інших метаболічних процесів, які пригнічуються під дією етанолу, або ж енергетичними субстратами, що впливають на інші симптоми похмілля [78, 146, 166];

- засоби з лікарської рослинної сировини або її екстрактивні речовини (препарати розторопші, дигідромірицетин, настоянка женьшеню тощо), що є рослинними антиоксидантами, гепатопротекторами й адаптогенами, які перешкоджають розвитку астенічних станів [126];

- кофеїн та кофеїновмісні засоби, що використовують для усунення слабкості й головного болю, викликаних похміллям [158, 166];

- активоване вугілля, що використовують для полегшення симптомів похмілля з боку шлунково-кишкового тракту (ШКТ) – нудоти, блювання, диспептичних розладів [123].

1.2 Епідеміологія споживання алкогольних напоїв

Для об'єктивного оцінювання епідеміологічних даних щодо споживання алкоголю треба правильно розуміти поняття «вживання алкоголю» та «зловживання», бо ця інформація може мати доволі суттєві географічні відмінності, що насамперед зумовлено різним вмістом етанолу в традиційних алкогольних напоях у різних країнах. Наприклад, у Сполучених Штатах Америки (США) «стандартний» алкогольний напій містить 14 г етанолу, а в інших країнах світу це значення варіює в діапазоні від 10 до 15 г [107].

Важливо зауважити, що рекомендації щодо безпечного споживання алкоголю для чоловіків і жінок є дуже умовними, бо їх визначають не лише кількісним вживанням алкоголю в перерахунку на вміст етанолу [70]. Вони певною мірою залежать від індивідуальних особливостей, зокрема активності ферментних систем, залучених у метаболізм етанолу, етнічної та гендерної приналежності, віку, психоемоційного стану, наявності супутніх захворювань тощо [70, 94].

У рекомендаціях Департаменту охорони здоров'я США зазначено, що помірне вживання алкоголю прирівнюється до одного стандартного напою (14 г етанолу) на день для жінок або двох стандартних напоїв на день для чоловіків [165]. Непомірне споживання алкоголю (англ. *binge drinking*) передбачає споживання понад чотирьох стандартних напоїв для жінок або понад п'яти стандартних напоїв для чоловіків за один раз. Зловживання алкоголем, або алкоголізм (англ. *alcohol use disorder, AUD*), визначають як вживання надмірної та щодалі більшої кількості алкоголю з безуспішними спробами зменшити споживання; довготривале відновлення після вживання алкоголю; повторюване вживання алкоголю, коли це фізично небезпечно; стан, що характеризується стійкою тягою та неможливістю відмовитись від вживання алкоголю [94].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), сьогодні у світі середнє споживання алкоголю на душу населення на рік становить близько 6,4 л, до того ж цей показник зростає за останні роки, якщо порівнювати з 2005 р., коли споживання становило 5,5 л/рік [169]. Спеціалісти ВООЗ зазначають, що існують

суттєві географічні відмінності: найменше споживання алкоголю на душу населення виявлено на Близькому Сході та в Північній Африці, тоді як Східна Європа має одні з найбільших показників споживання алкоголю на душу населення. Проте варто констатувати й обнадійливу тенденцію до зниження цих показників в окремих країнах останнім часом [131, 169]. На жаль, спостерігають збільшення кількості жінок, які зловживають алкоголем, та неухильно зменшується вік тих, хто починає регулярно вживати алкогольні напої [169].

1.3 Наслідки зловживання алкоголем

Зловживання алкоголем належить до захворювань, які мають надзвичайно високу медико-соціальну значущість, що зумовлено не лише певною поширеністю, але й насамперед його наслідками. У країнах Європи, зокрема і в Україні, алкоголізм є першопричиною розвитку патологій печінки, а у США – третьою з причин передчасної смерті. Згідно з даними ВООЗ, алкоголізм призводить до 3,3 млн смертей щорічно (5,9 % всіх випадків смерті) та залишається тригерним фактором розвитку понад 200 захворювань і порушень здоров'я (у загальній структурі захворюваності – 5,1 % всіх нозологій). Розповсюдженість AUD варіює в діапазоні від 13 % до 30 % (близько 20 % чоловіків і 10 % жінок) у більшості країн західної Європи [70, 168]. Крім того, із 42 % пацієнтів, госпіталізованих до лікарень загального профілю, третину було переведено у відділення інтенсивної терапії [171], а майже 50 % пацієнтів, госпіталізованих у психіатричні відділення, мали в анамнезі AUD [41]. Серед патологій, що розвиваються на тлі хронічного алкоголізму, найпоширенішими є ураження печінки (алкогольна хвороба печінки, цироз печінки тощо), різні види онкопатологій, порушення з боку центральної нервової системи (ЦНС) та ШКТ тощо [145, 168].

Не викликає сумніву, що навіть епізодичне споживання алкоголю може призвести до негативних наслідків, зокрема розвитку похмільного синдрому, який характеризується комплексом симптомів, серед яких гострий головний біль, сонливість, слабкість, нудота, іноді з блювотою, пригнічений настрій, тремор рук,

порушення концентрації уваги. Саме ці скарги є найпоширенішими під час звернення відвідувачів аптеки. Зазначене визначає необхідність створення та дослідження нових напрямів і засобів фармакологічної корекції наслідків як епізодичного, так і хронічного зловживання алкоголем, а також удосконалення тих шляхів фармакологічної корекції, що існують наразі [168].

1.4 Біохімічні механізми патогенезу алкогольної інтоксикації

1.4.1 Порушення нейротрансмісії у ЦНС

Попри значну поширеність алкоголізму, біохімічні механізми, що лежать в основі низки порушень, які розвиваються на тлі алкогольної інтоксикації, залишаються не до кінця з'ясованими. Тому їх вивчення і розуміння є ключовими складовими в пошуку шляхів ефективної та безпечної фармакокорекції патологічних змін [27].

Добре відомо, що етанол має значний вплив на певні нейромедіаторні системи головного мозку. Саме із цим пов'язують формування неврологічних проявів, що мають місце в разі зловживання алкоголем – емоційна лабільність, депресія, делірій, синдром Верніке-Корсакова тощо [5, 32].

Відповідно до даних наукової літератури виокремлюють декілька основних механізмів алкогольних уражень центральної нервової системи (ЦНС): порушення функціонування γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) – основного гальмівного нейромедіатора ЦНС, дисбалансу інших біогенних амінів (глутамату, дофаміну, серотоніну тощо), а також зміни реологічних властивостей клітинних мембран у нервовій системі за дії етанолу. Проте дані нещодавніх досліджень підтвердили, що етанол специфічно та вибірково змінює синаптичну дію глутамату (головного збуджувального нейромедіатора головного мозку), що свідчить про важливу роль глутаматергічної нейрональної дисфункції за виникнення гострих і хронічних випадків зловживання етанолом [29, 67, 134].

Переважним електрофізіологічним ефектом етанолу є зниження збудливої дії глутаматергічної синаптичної нейротрансмісії, зокрема етанол зменшує ймовірність відкриття каналу NMDA з супутнім зменшенням середнього часу, коли канал перебуває у відкритому стані. Здатність етанолу пригнічувати активність NMDA-рецепторів різна в різних зонах головного мозку. Наприклад, у деяких дослідженнях зазначено, що етанол викликає дозозалежне інгібування активації NMDA-рецепторів нейронів медіальної перегородки, але не нейронів у бічній перегородці [55, 76]. З огляду на роль глутамату, як домінантного збудливого нейромедіатора в ЦНС, очікуваним ефектом пригнічення етанолом NMDA-рецепторів постає опосередкована дизрегуляція і інших нейромедіаторних систем [55, 76, 129].

Високі концентрації етанолу різко пригнічують вивільнення серотоніну, дофаміну, норадреналіну, глутамату, аспартату і ГАМК, зокрема й через модуляцію активності NMDA-рецепторів. Добре відомо, що хронічне втручання в нейротрансмітерну функцію медіатора мозку зазвичай призводить до посилення або гіперчутливості постсинаптичних рецепторів. Було виявлено, що підвищена чутливість NMDA-рецепторів нейронів *locus coeruleus* до норадреналіну особливо сприяє розвитку тривожності та вегетативній нестабільності під час відмови від етанолу (прояв абстинентного синдрому та додатковий фактор формування стійкої алкогольної залежності) [55].

Під час відмови від алкоголю відбувається синаптичне вивільнення глутамату й рівень його тканинної концентрації збільшується разом із посиленням регуляції NMDA-рецепторів. Це супроводжується розвитком ексайтотоксичності, для якої характерна загибель нейронів. Відповідно, нейрони, які постійно піддаються впливу етанолу, значно сприйнятливіші до дегенеративних змін, спричинених надмірною продукцією глутамату, що своєю чергою опосередковується дизрегуляцією NMDA-рецепторів [25, 37, 44, 53]. Клінічними проявами цих патологічних змін є порушення поведінки, агресія, порушення когнітивних функцій, алкогольний психоз, судоми та тремор. Це узгоджується з

даними щодо підвищеного ризику розвитку епілепсії в осіб, які хронічно зловживають алкоголем [30, 87, 108, 164].

Зазначена гіпотеза не заперечує дані щодо порушень ГАМК-ергічної системи, бо глутамат та ГАМК мають спільні метаболічні шляхи (глутамат – метаболічний попередник ГАМК, що утворюється під впливом глутаматдекарбоксилази – піридоксаль-залежного ферменту). Також відомо, що деякі характерні клінічні прояви алкогольної абстиненції передбачають гіперзбудження нервової системи, що можна пояснити дисбалансом глутамат- та ГАМК-ергічної нейротрансмісії. Сьогодні фармакотерапія алкогольної інтоксикації охоплює переважно препарати, дія яких спрямована на активацію ГАМК рецепторів, тоді як вплив на глутаматергічну регуляцію може бути дуже перспективним напрямом корекції, зокрема, для купірування неврологічної симптоматики алкоголізму [41, 87, 122].

Важливо зазначити, що один із найпоширеніших патологічних проявів алкоголізму – синдром Верніке-Корсакова, який характеризується порушеннями поведінки, амнезією та пригніченням когнітивних функцій, з етіологічного погляду класифікують як стан, викликаний стійким дефіцитом тіаміну (який є характерний для хронічного алкоголізму). Проте літературні дані свідчать, що за синдрому Верніке-Корсакова прогресивна дегенерація нейронів переважно є наслідком ексайтотоксичності. Відповідно, обтяження перебігу цього стану і формування тяжких неврологічних порушень тісно пов'язані з глутаматергічною дизрегуляцією [32, 33, 93, 153, 167].

1.4.2 Алкогольна хвороба печінки

Не викликає сумніву, що саме ураження печінки є найбільш характерним наслідком хронічного зловживання алкоголем, що зумовлено насамперед есенціальною роллю гепатоцитів у детоксикації ксенобіотиків, до яких належить етанол. Клініко-епідеміологічні дані підтверджують, що в структурі нозологій, які

формуються в осіб з алкоголізмом, саме ураження печінки посідають провідне місце [69, 97, 168].

Важливо зазначити, що довготривале споживання алкоголю корелює з розвитком алкогольної хвороби печінки (АХП), тоді як цироз розвивається тільки в незначної частини осіб із хронічним алкоголізмом. Таку закономірність можна пояснити тим, що ризик розвитку цирозу суттєво залежить від кількості споживаного алкоголю (понад 30 г етанолу на добу, а найвищий ризик пов'язаний із споживанням 120 г/добу). А проте тривалість і регулярність зловживання алкоголем зумовлюють формування порушень різних метаболічних ланок, наслідком чого є розвиток стеатозу та в подальшому – фібротичних змін і цирозу [54, 61].

АХП – це узагальнювальне поняття для різних нозологічних форм уражень печінки, які розвиваються на тлі регулярного споживання гепатотоксичних доз етанолу. Основними формами АХП є жирова дистрофія печінки, алкогольний стеатогепатит (АСГ) та цироз. Із цим кожна із зазначених патологій характеризується специфічними морфологічними, біохімічними змінами та клінічними симптомами [66, 99].

Важливо зауважити, що наразі фіксують несприятливу тенденцію до збільшення кількості пацієнтів із патологіями печінки, серед яких різні форми АСГ займають домінантні позиції, зокрема, згідно з даними українських спеціалістів, за останні роки кількість випадків зросла майже на 80 %. Але саме АСГ залишається найбільш значущим не лише за кількістю випадків, але й за тяжкістю наслідків як для пацієнта (передчасна смертність, інвалідизація тощо), так і для системи охорони здоров'я загалом (витрати на діагностику та лікування, навантаження на лікарні і фахівців тощо). На жаль, АСГ є несприятливим з погляду прогнозу захворюванням – приблизно половина пацієнтів помирає протягом півроку з моменту маніфестації клінічних проявів, що вкотре підкреслює актуальність досліджень у цьому напрямі [19, 96, 99, 132].

АСГ характеризується патологічними змінами практично всіх метаболічних ланок, проте одним із тригерних механізмів ураження гепатоцитів є нагромадження

ліпідів у тканині печінки, спровоковане хронічним надходженням в організм етанолу. Патогенез АСГ охоплює взаємозумовлені біохімічні механізми, які передбачають дисбаланс анаболічних (синтез жирних кислот) та катаболічних (окиснення жирних кислот) процесів, а також порушення процесів транспорту ліпідів із печінки [66, 99, 118, 156]:

- ймовірно, тригерним фактором постає накопичення в гепатоцитах нікотинамідаденіндинуклеотид НАДН(Н⁺) – це закономірний результат метаболізму етанолу. Проте накопичення цієї сполуки супроводжується зсувом співвідношення НАДН(Н⁺)/НАД⁺ у клітинах печінки, що інтенсифікує синтез жирних кислот *de novo*. Це зумовлено участю НАДН(Н⁺) у синтезі гліцерол-3-фосфату та естерифікації жирних кислот [66, 118];

- одночасно відбувається порушення утилізації жирних кислот через зниження інтенсивності процесу β-окиснення внаслідок пригнічення рецептора, що активується проліфератором пероксисом (PPARα). Добре відомо, що накопичення ацетальдегіду (метаболіт, що утворюється в разі детоксикації етанолу) інгібує експресію PPARα. Відповідно, ступінь пригнічення β-окиснення визначають як кількістю споживаного етанолу, так і регулярністю його вживання [66, 99, 118, 156].

Отже, за умов регулярного вживання етанолу, з одного боку, має місце активація утворення жирних кислот через інтенсифікацію їх синтезу, а з іншого – порушується фізіологічний механізм їх утилізації – процес β-окиснення. Тож у гепатоцитах починають накопичуватись ліпіди за одночасного зменшення енергозабезпечення [62]. Саме ж окиснення жирних кислот є одним із найбільш важливих процесів з погляду продукції енергії у формі аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) [62, 71].

Закономірно, що за таких умов має активуватись інший механізм, спрямований на пригнічення накопичення ліпідів – збільшення їх транспортування до інших тканин. Зокрема, для цього необхідно збільшити формування та секрецію ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), а також залучити до їх складу ендогенні триацилгліцероли (ТАГ), але цього не відбувається через негативний

вплив етанолу на синтез транспортних ліпопротеїнів [51, 101]. Отже, наслідком зазначених патологічних змін є активна акумуляція ліпідів у печінці, що призводить до порушення функціонального стану гепатоцитів, а відтак і поступового пригнічення детоксиційної здатності, що за принципом «порочного кола» обтяжує перебіг АСГ [51, 100, 101].

Через те що печінка є надзвичайно активним з метаболічного погляду органом, порушення функціонування гепатоцитів супроводжуватиметься порушеннями всіх видів обміну. Окремо варто сказати про патологічні зміни у метаболізмі сірковмісних амінокислот, зокрема зниження утворення S-аденозилметіоніну (SAM) із метіоніну та порушення перетворення гомоцистеїну на метіонін і цистеїн. Деякі науковці зазначають підвищення концентрації гомоцистеїну в осіб, які хронічно зловживають алкоголем [92, 147]. Гіпергомоцистеїнемія належить до біохімічних маркерів високого кардіоваскулярного ризику – як предиктор атеросклеротичного ураження судин (або прогресування цього стану) та хвороби Альцгеймера. Дослідження останніх років підтверджують значущість гіпергомоцистеїнемії в патогенезі розвитку й прогресуванні уражень печінки, зокрема АСГ, що також пов'язано із формуванням стресу ендоплазматичного ретикулуму та подальшою індукцією апоптозу [92, 117, 147, 160].

1.4.3 Окисний стрес

Відомо, що за етанольної інтоксикації однією із ключових патологічних змін є активація вільнорадикальних процесів, що є закономірним наслідком біохімічних особливостей метаболізму етанолу в організмі людини [73]. Ферменти біотрансформації етанолу потребують наявності певних коферментів – НАДФН(Н⁺) та НАД⁺(внутрішньомітохондріального), а також енергії у вигляді АТФ. Під час детоксикації етилового спирту змінюються співвідношення відновлених та окиснених еквівалентів зазначених коферментів, наслідком чого є пригнічення перебігу процесів, до яких вони залучаються за фізіологічних умов

[23, 77]. Зокрема, НАДФН(Н⁺) входить до складу ферменту глутатіонредуктаза, який необхідний для відновлення глутатіону. Тому нестача НАДФН(Н⁺) супроводжується пригніченням утворення відновленого глутатіону, який має важливе значення для реалізації антиоксидантного захисту [45, 73]. Крім того, синтез глутатіону може знижуватись через дефіцит амінокислот, які входять до його складу (глутамінова кислота, цистеїн, гліцин). Останнє може розвиватись через різні причини – глутамінова кислота залучається до тимчасового знешкодження аміаку, синтезу ГАМК, пере- і трансамінування та деяких інших процесів; цистеїн утворюється в процесі обміну сірковмісних амінокислот (метіоніну та гомоцистеїну), але за умов алкоголізму ці перетворення можуть пригнічуватись через нестачу вітаміну В6 та його коферментної форми – піридоксальфосфату, який є коферментом низки ферментів, залучених до метаболізму амінокислот (це є однією з причин розвитку гіпергомоцистеїнемії у людей, які страждають на алкоголізм) [118, 154]. Гліцин є замінною амінокислотою і зазвичай його дефіциту не спостерігають, проте він виконує нейромедіаторні функції і за умов зниження утворення гальмівних медіаторів (ГАМК) він може більш активно використовуватись для регуляції процесів збудження в головному мозку. Отже, всі три компоненти, необхідні для біосинтезу глутатіону, можуть бути в дефіциті на тлі алкогольної інтоксикації, а тому формувати передумови для інтенсифікації вільнорадикальних процесів. Зазначене призводить до посилення виразності та тривалості клінічних симптомів похмільного синдрому, а за умов регулярного зловживання алкоголем формує передумови для активації проапоптотичних змін [26, 118, 154].

1.4.4 Дефіцит енергії та енергетичних субстратів

Серед біохімічних механізмів, залучених до формування алкогольної інтоксикації, принципове значення має саме енергодефіцит клітин. Це зумовлено насамперед тим, що гіпоенергетичний стан буде навіть за умов однократного вживання алкоголю (одна з провідних причин формування низки клінічних проявів

похмільного синдрому), а на тлі хронічного алкоголізму це постане одним із ключових факторів розвитку неврологічних порушень, більшість із яких мають необоротний характер [63, 114, 170].

На ранніх етапах етанольної інтоксикації відбудуватиметься пригнічення окиснення енергетичних субстратів (глюкози, жирних кислот) через перерозподіл внутрішньоклітинних ресурсів: детоксикація етанолу є першочерговою, що створює дефіцит інтрамітохондріального пулу НАД⁺, який необхідний для функціонування ферментів гліколізу, циклу трикарбонових кислот, β -окиснення та інших метаболічних шляхів, що супроводжуються утворенням енергії [40, 66, 115, 152].

У гепатоцитах та нирках активно відбуваються реакції глюконеогенезу, до якого залучаються карбонові скелети амінокислот, що утворюються за дезамінування. Але на тлі алкогольної інтоксикації цей процес може пригнічуватись не лише через нестачу необхідних коферментів, але й через відволікання амінокислот до інших процесів [66, 152].

Глутамат (у процесі прямого дезамінування) та аланін (переамінування) перетворюються на α -кетоглутарову й піровиноградну кислоти, які в подальшому залучаються не лише у цикл трикарбонових кислот, але і в глюконеогенез. Під впливом алкоголю пул зазначених амінокислот зменшуватиметься, наслідком чого буде пригнічення інтенсивності певних енергозабезпечувальних процесів. Насамперед результатом стане порушення функціонування нервової системи, яка є найбільш чутливою до нестачі енергії [33, 36, 75, 95].

За хронічної інтоксикації пригнічення глюконеогенезу провокуватиме порушення функціонального стану скелетних м'язів (м'язова дистрофія є характерною для осіб, які зловживають алкоголем) та нирок (аналогічна ситуація із порушенням функціонування нефронів) [31, 46, 148]. З огляду на важливу роль енергозабезпечення клітин у підтримці їхнього фізіологічного стану корекція алкогольної інтоксикації має обов'язково передбачати наявність легкозасвоюваних енергетичних субстратів, зокрема глюкози як основного енергетичного джерела всіх тканин організму й насамперед головного мозку. Крім того, лише вуглеводи

можуть слугувати джерелом енергії за умов гіпоксії (шляхом залучення до анаеробного гліколізу), що також необхідно враховувати, бо гіпоксія тканин є характерною в разі етанольної інтоксикації [32, 33, 48].

1.5 Фармакологічна та нефармакологічна корекція похмільного синдрому

Для раціональної та безпечної фармакологічної корекції порушень, спричинених вживанням алкоголю, треба розрізняти ступінь виразності похмільного синдрому: легку форму (в англійській літературі виокремлюють поняття «*hangover syndrome*») та більш тяжку форму («*alcohol withdrawal syndrome* – *AWS*»), підходи до корекції яких мають суттєві відмінності [46].

«*Hangover syndrome*» характеризується низкою фізичних (головний біль, астения, тремор, пітливість, почервоніння очей, міалгія, полідипсія, систолічна артеріальна гіпертензія і тахікардія) і психічних симптомів (запаморочення, світлобоязнь, підвищена чутливість до шуму, когнітивні розлади й емоційна лабільність, депресія, тривожність і дратівливість) [46, 121]. Симптоми досягають піку, коли концентрація алкоголю в крові сягає нуля і може тривати протягом наступних 24 год. Існують фактори, які посилюють інтенсивність клінічних проявів, зокрема голодування, недосипання (як за якістю, так і за кількістю) і підвищена фізична активність під час гострої алкогольної інтоксикації (через прискорену біотрансформацію етанолу в організмі) [88].

Легка форма похмільного синдрому може купіруватись самостійно або потребувати чи короткотривалої корекції раціону харчування (збільшення вживання рідини, фруктових соків як джерела фруктози, складних вуглеводів для корекції гіпоглікемії тощо), чи використання безрецептурних препаратів, зокрема й комбінованих [46].

Окремо варто визначити раціональність застосування кожної групи лікарських засобів, що їх найчастіше використовують у складі комбінованої фармакокорекції. Антациди використовують з метою симптоматичного лікування

(купірування) шлунково-кишкових розладів, зокрема нудоти, блювоти та печії (відомий ефект алкоголю – підвищення кислотності шлункового соку) [43].

Амінокислоти є невід’ємними учасниками нормального метаболізму і виконують певні есенціальні функції, які можуть порушуватись на тлі вживання алкоголю, а тому їх використання може суттєво поліпшувати перебіг похмільного синдрому. Зокрема, глутамінова кислота виконує низку важливих функцій у клітинах, постаючи нейромедіатором (та попередником для іншого нейромедіатора – ГАМК), формою тимчасового знешкодження і транспортування аміаку з головного мозку й інших тканин під час перенесення останнього в гепатоцити для утилізації в циклі синтезу сечовини [43, 47]. З огляду на те, що патогенез похмільного синдрому передбачає порушення метаболізму глутамату, використання цієї амінокислоти у складі фармакокоректорів є доцільним для запобігання амонійної інтоксикації, яка суттєво обтяжує перебіг алкогольної інтоксикації. Механізми токсичності аміаку відволікають α -кетоглутарат від циклу трикарбонових кислот (для тимчасового знешкодження і утворення транспортної форми – глутамату) та формують енергетичний дефіцит клітин головного мозку. У випадку застосування екзогенного глутамату ця проблема вирішується, тому що сам глутамат може поставати акцептором молекули аміаку, що супроводжується утворенням амінокислоти глутаміну (реакція каталізується глутамінсинтетазою), яка й транспортується у печінку для подальшого знешкодження аміаку [155]. У печінці від глутаміну (під впливом глутамінази з утворенням глутамату) та від глутамату (під дією глутаматдегідрогенази) відбувається відщеплення аміаку й утворення α -кетоглутарату, який залучається до процесів утворення енергії в циклі Кребса (одним із субстратів якого є бурштинова кислота, яка має антигіпоксичні властивості, що додатково позитивно впливає на стан клітин і тканин). Крім того, глутамат, як і гліцин, входить до складу глутатіону, який виконує антиоксидантну функцію та пригнічує ушкоджувальний вплив окисного стресу, характерного для алкогольної інтоксикації. Саме тому застосування глутамінової кислоти і гліцину є доцільним у разі алкогольної інтоксикації з огляду на полівалентний вплив щодо корекції певних складових патогенезу [43, 47, 155].

Одним із найбільш частих симптомів похмільного синдрому є головний біль і міалгія, спричинені пошкодженням і руйнуванням структури клітинних мембран внаслідок дії етанолу та його метаболітів. Тому одним із компонентів засобів для купірування похмілля є ацетилсаліцилова кислота й інші нестероїдні протизапальні препарати, бо вони пригнічують продукцію протизапальних простагландинів, що утворюються в результаті метаболізму арахідонової кислоти і викликають больовий синдром [46, 90]. Ацетилсаліцилова кислота має доведену клінічними випробуваннями ефективність щодо купірування болю в разі алкогольної інтоксикації. Крім того, у пацієнтів зі схильністю до тромбозів вживання алкоголю може супроводжуватись ризиком підвищення зсідання крові та розвитку тромботичних ускладнень (зокрема й за рахунок вивільнення тромбоксанів). Для запобігання таким наслідкам теж доцільно використовувати ацетилсаліцилову кислоту, яка має антиагрегантні властивості [34, 46, 90, 112].

У патогенезі алкогольної інтоксикації одна із ключових ролей належить порушенню енергозабезпечення клітин через дефіцит джерел енергії. Тому з метою корекції цих патологічних змін доцільно застосовувати легкозасвоювані джерела енергії, зокрема вуглеводної природи (глюкоза, фруктоза тощо), бо їх можуть використовувати всі типи клітин у процесах енергопродукування, а також вони слугують субстратом для продукції АТФ за умов гіпоксії, яку часто спостерігають на тлі вживання алкоголю [91, 159].

За даними наукової літератури, застосування вітамінних препаратів може суттєво поліпшувати перебіг похмільного синдрому. Аскорбінова кислота, що не синтезується в організмі людини, є основним водорозчинним антиоксидантом, необхідним не лише для пригнічення вільнорадикальних процесів, а й для зменшення виразності депресивних розладів, бо запобігає окисним модифікаціям молекул дофаміну [41, 46, 98]. Крім того, часто застосовують вітаміни групи В: тіамін – для лікування та профілактики синдрому Верніке-Корсакова, а також через його залучення до метаболізму глюкози й утворення енергії; вітамін В6 (коферментна форма піридоксальфосфат), який необхідний для нормального метаболізму біогенних амінів – ГАМК, глутамату, серотоніну та катехоламінів [58,

157]. Попри те, що доцільність монотерапії вітамінними препаратами не доведено, їх додавання до складу комплексних засобів може бути корисним для корекції певних складових патогенезу похмільного синдрому [24].

У випадку ж більш важкої форми похмільного синдрому (AWS) насамперед визначають його виразність, для чого використовують критерії «Рекомендацій з діагностики та статистичного врахування психічних розладів» (англ. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-V*) [54, 102]. Відповідно до сучасних критеріїв AWS визначають як: (а) припинення або зменшення вживання алкоголю, яке було важким і тривалим; (б) два (або більше) з названих далі, що розвиваються протягом кількох годин або кількох днів після критерію (а): вегетативна гіперактивність, підвищений тремор рук, безсоння, нудота або блювота, транзиторні зорові/слухові/тактильні галюцинації або ілюзії, психомоторне збудження, тривога та генералізовані тоніко-клонічні судоми [54].

У разі діагностування AWS фармакокорекція потребує призначення лікарем рецептурних препаратів для купірування як фізичних, так і психічних проявів із подальшим оцінюванням стану пацієнта в динаміці [61].

У цьому випадку вибір терапевтичної стратегії визначають з огляду на тяжкість симптомів. Вона передбачає препарати бензодіазепінового ряду (діазепам, оксазепам, лоразепам тощо), які вважають «золотим стандартом», бо в дослідженнях вони продемонстрували подібну до нейролептиків, клонідину, бета-блокаторів та протисудомних препаратів ефективність щодо усунення симптомів відміни [38, 56, 58]. Крім того, саме похідні бензодіазепіну мають підтверджену ефективність щодо запобігання розвитку ускладнень за AWS та зменшення частоти розвитку судом на 84 %, ризику делірію та асоційованого ризику передчасної смерті. Механізм реалізації їх високої ефективності пов'язаний із модуляцією ГАМК-А сайту бензодіазепінового рецептора, бо порушення ГАМК-ергічних механізмів є типовим у разі похмільного синдрому. Також бензодіазепіни є препаратами вибору для пацієнтів із високим ризиком розвитку важких проявів AWS, зокрема судом [56, 58].

До препаратів із доведеною ефективністю також належать препарати з ГАМК-ергічною активністю – натрію оксипутират та баклофен, які у рамках клінічних випробувань продемонстрували порівнянну ефективність із бензодіазепінами щодо купірування симптомів збудження, депресії та тривожності [42]. Препарат клонетіазол – анксиолітик також був ефективний щодо пригнічення психомоторного збудження, тривожності та депривації сну на тлі AWS. Механізми реалізації їх ефективності можна пояснити відновленням балансу нейромедіаторів у ЦНС, зокрема рівня ГАМК та, ймовірно, модуляції активності NMDA-рецепторів. До альтернативних засобів корекції AWS належить також антагоніст дофамінових D₂ та D₃ рецепторів – тіаприд, який часто використовують з метою купірування гіперкінетичних розладів, агресії, тремору та тривожності. У клінічних дослідженнях тіаприд не викликав пригнічення дихання і не знижував концентрацію уваги в пацієнтів під час терапії. Проте цей препарат не має ефективності щодо купірування галюцинацій та судом [149]. Деякі протисудомні препарати (вальпроєва кислота, карбамазепін, прегабалін тощо) були ефективні щодо запобігання та купірування судомного синдрому в пацієнтів із AWS, але не продемонстрували достатньої клінічної ефективності щодо інших проявів похмільного синдрому [109, 127].

Отже, для адекватної терапії похмільного синдрому треба зважати на тяжкість проявів останнього й передбачати препарати, які впливають на різні складові патогенезу патології.

Висновки до розділу I

1. Аналіз літературних джерел свідчить, що біохімічні механізми патогенезу алкогольної інтоксикації (порушення нейротрансмісії у ЦНС, алкогольна хвороба печінки, окисний стрес, дефіцит енергії та енергетичних субстратів) характеризуються комплексом симптомів, серед яких гострий головний біль, сонливість, слабкість, нудота, іноді з блювотою, пригнічений настрій, тремор

рук, порушення концентрації уваги, які виникають унаслідок токсичної дії спиртів або продуктів їх метаболізму на організм людини, що потребує фармакокорекції.

2. Визначено, що для сучасної фармакотерапії алкогольної залежності та / або алкогольної інтоксикації використовують ряд ЛЗ та дієтичних добавок. Серед лікарських засобів переважна більшість представлена однокомпонентними засобами (91 %) у вигляді ін'єкційної лікарської форми (44 %) або таблеток (40%), у той час як кількість комбінованих лікарських засобів, які б впливали на усунення усіх проявів і зменшували або запобігали наслідкам алкогольної інтоксикації, обмежена та не задовольняє потреби пацієнтів.

3. Встановлено, що згідно з рекомендаціями із надання фармацевтичної опіки в разі похмільного синдрому можна використовувати засоби, що діють на нервову систему, гепатопротектори, нестероїдні протизапальні засоби тощо, які залежно від вмісту АФІ впливають на усунення окремих симптомів патології.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні фармацевтична розробка ЛЗ складається із декількох етапів, серед яких:

- вибір АФІ, допоміжних речовин, досягнення сумісності компонентів;
- вибір ЛФ та визначення її функціональних характеристик;
- розроблення технологічного процесу та вибір критичних стадій виробництва;
- розроблення методик контролю якості для визначення стабільності й терміну придатності ЛФ;
- вибір пакувального матеріалу;
- дослідження фармакологічних, біофармацевтичних, споживчих характеристик розробленого ЛЗ.

2.1 Характеристика АФІ та допоміжних речовин як об'єктів дослідження

Діючими компонентами ЛЗ для фармакотерапії алкогольної інтоксикації у формі порошку було обрано такі АФІ: гліцин, глютамінова кислота, ацетилсаліцилова кислота та аскорбінова кислота, які за якістю відповідають вимогам Європейської фармакопеї та Державної фармакопеї України (ЄФ/ДФУ) [7, 8, 72].

Допоміжні речовини, обрані під час створення складу препарату, описано у Європейській фармакопеї і внесено до «Переліку назв допоміжних речовин, які входять до складу лікарських засобів», затвердженого Наказом МОЗ України від 19.06.2007 р. № 339 [72].

2.1.1 Активні фармацевтичні інгредієнти

Гліцин ($C_2H_5NO_2$, 2-амінооцтова кислота); М.м. 75,1; $pK_a = 2,34$ (по $COOH$); 9,58 (по NH_2); $\log P = -3,21$; номер CAS 56-40-6 [7, 72].

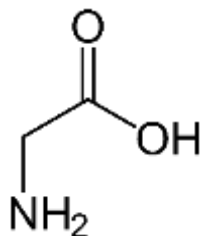


Рис. 2.1 Хімічна структура гліцину

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Легко розчинний у воді *P*, дуже мало розчинний в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: регулятор обміну речовин; виявляє міцну антитоксичну й церебропротекторну дії; ефективно знижує токсичні ефекти алкоголю.

У роботі використовували гліцин (с. 2004130449) виробництва компанії Hebei Huayang Biological Technology Co., Ltd, Китай.

Глутамінова кислота ($C_5H_9NO_4$); М.м. 147,1; $pK_a = 2,16, 4,15, 9,58$; $\log P = -3,69$; номер CAS 56-86-0 [7, 72].

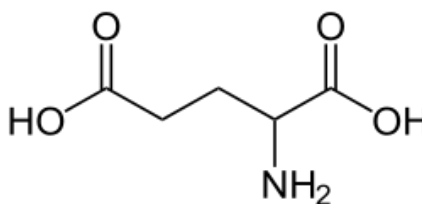


Рис. 2.2 Хімічна структура глутамінової кислоти

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору чи безбарвні кристали. Легко розчинна в киплячій воді *P*, мало розчинна в холодній воді *P*, практично не розчинна в оцтовій кислоті *P*, ацетоні *P* та етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: антиоксидант, амінокислота; прискорює процес виведення етанолу, ацетальдегіду з організму, знижує їх токсичний вплив [47].

У роботі використовували глютамінову кислоту (с. SLBS0553V) виробництва компанії Sigma Aldrich, США.

Ацетилсаліцилова кислота ($C_9H_8O_4$, 2-(ацетилокси)бензойна кислота);
М.м. 180,2; $pK_a = 3,7$; $\log P = 1,19$; номер CAS 50-78-2 [7, 72].

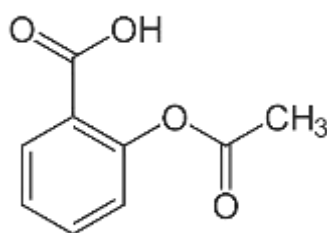


Рис. 2.3 Хімічна структура ацетилсаліцилової кислоти

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору чи безбарвні кристали. Мало розчинна у воді *P*, легко розчинна в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: виявляє виражену протизапальну, жарознижувальну і анальгетичну дію.

У роботі використовували ацетилсаліцилову кислоту (с. 21787) виробництва компанії Shandong Xinhua Pharmaceutical Ltd Co., Китай.

Аскорбінова кислота ($C_6H_8O_6$, (5R)-5-[(1S)-1,2-Дигідроксиетил]-3,4-дигідроксифуран-2(5H)-он); М.м. 176,1; $pK_a = 4,10, 11,6$; номер CAS 50-81-7 [7, 72].

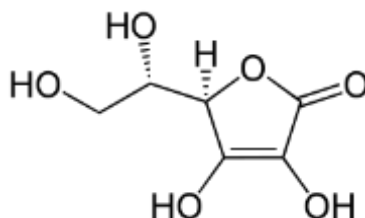


Рис. 2.4 Хімічна структура аскорбінової кислоти

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору чи безбарвні кристали, що змінюють колір під впливом повітря і вологи. Легко розчинна у воді *P*, помірно розчинна в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: антиоксидант, стабілізатор; сприяє оптимальному перебігу тканинного обміну; бере активну участь в окисно-відновних реакціях, утворюючи з дегідроаскорбіною кислотою систему перенесення протона водню, проявляє властивості антиоксиданту, за рахунок чого забезпечує стабільність клітинних мембран.

У роботі використовували аскорбінову кислоту (с. DYD2622000008) виробництва компанії Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd, Китай.

2.1.2 Допоміжні речовини

Сорбіт ((2S,3R,4R,5R)-гексан-1,2,3,4,5,6-гексол); М.м. 182,17; $pK_a = 13,6$; $\log P = -4,67$; номер CAS 50-70-4 [7, 72].

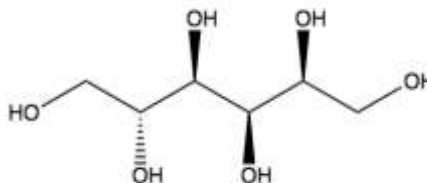


Рис. 2.5 Хімічна структура сорбіту

Функціональне призначення: наповнювач, коригент смаку.

У роботі використовували сорбіт (с. 19060802) виробництва компанії Shijiazhuang Ruixue Pharmaceutical Ltd Co., Китай.

Фруктоза ($C_6H_{12}O_6$, D-арабіно-Гекс-2-улопіраноза); М.м. 176,1; $pK_a = 13,6$, 12,06; $\log P = -2,4$; номер CAS 57-48-7 [7, 72].

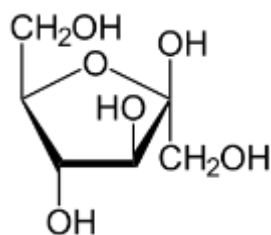


Рис. 2.6 Хімічна структура фруктози

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору, дуже солодкий на смак. Дуже легко розчинна у воді *P*, розчинна в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: наповнювач, коригент смаку.

У роботі використовували фруктозу (с. 40000174936) виробництва компанії ADM, США.

Глюкоза безводна ($C_6H_{12}O_6$, (+)-D-Глюкопіраноза); М.м. 180,2; $pK_a = 11,3$; $\log P = -3,24$; номер CAS 50-99-7 [7, 72].

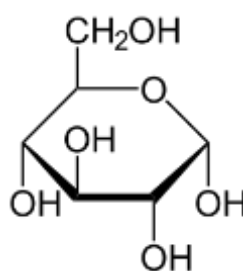


Рис. 2.7 Хімічна структура глюкози

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору, із солодким смаком. Легко розчинна у воді *P*, помірно розчинна в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: наповнювач, коригент смаку.

У роботі використовували глюкозу виробництва компанії ADM, США.

Сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$, α -D-глюкопіранозил-(1,2)- β -D-фруктофуранозид); М.м. 342,30; $pK_a = 12,7$; $\log P = -3,76$; номер CAS 57-50-1.

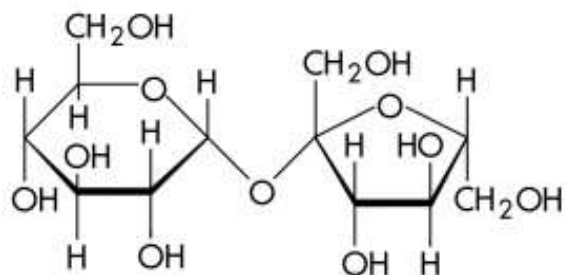


Рис. 2.8 Хімічна структура сахарози

Функціональне призначення: наповнювач, коригент смаку.

У роботі використовували сахарозу виробництва компанії ADM, США.

Лимонна кислота безводна ($C_6H_8O_7$, 2-гідроксипропан-1,2,3-трикарбонова кислота); М.м. 192,1; $pK_a = 3,128\ 4,761\ 6,388$; $\log P = -1,64$; номер CAS 77-92-9 [7, 72].

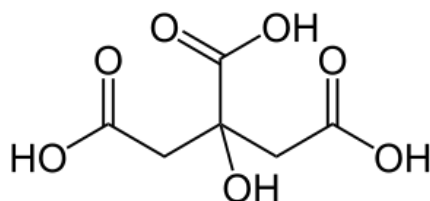


Рис. 2.9 Хімічна структура кислоти лимонної

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору, безбарвні кристали або гранули. Вивітрюється на повітрі. Дуже легко розчинна у воді *P*, легко розчинна в етанолі (96 %) *P* [7, 72].

Функціональне призначення: модифікатор кислотно-лужного балансу, коригент смаку.

У роботі використовували лимонну кислоту безводну (с. 00400159) виробництва компанії ТД «Макрохім», Україна.

Натрію гідрокарбонат ($NaHCO_3$); М.м. 84,0; $pK_a = 6,34, 6,351$; $\log P = -4,01$; номер CAS 144-55-8 [7, 72].

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Розчинний у воді *P*, практично не розчинний в етанолі (96 %) *P*. Нагрівання сухої субстанції або її розчину призводить до поступового перетворення на натрію карбонат [7, 72].

Функціональне призначення: наповнювач, модифікатор кислотно-лужного балансу.

У роботі використовували натрію гідрокарбонат (с. 01/2020) виробництва компанії FS Dis Ticaret Limited Sirketi, Турція.

2.2 Відомості про прилади, обладнання, стандартні зразки, розчинники та реактиви

Розробку ЛФ та її стандартизацію проводили на обладнанні Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів Навчально-наукового інституту прикладної фармації НФаУ. Всі прилади лабораторії атестовано в повному обсязі, вони мають відповідні свідоцтва про перевірку.

Хімічний посуд. Під час роботи використовували хімічний мірний посуд класу А (першого класу) фірми Simax (Чехія).

Стандартні зразки:

- Глутамінова кислота (с. SLBS0553V, виробник Sigma Aldrich);
- Гліцин (с. LRAA8813, виробник Sigma Aldrich);
- Аскорбінова кислота (с. DYD2622000008, виробник Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd);
- Ацетилсаліцилова кислота (с. 21787, виробник Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd);
- Саліцилова кислота (с. 3, EP CRS);
- Сорбіт (с. 19060802, виробник Shijiazhuang Ruixue Pharmaceutical Co., Ltd).

Розчинники, реактиви та робочі розчини. В експериментальних дослідженнях використовували воду *P*, воду для хроматографії *P* та інші

розчинники й реактиви відповідної якості та чистоти, що відповідають вимогам ЄФ/ДФУ [8, 72].

Робочі розчини готували відповідно до методик, наведених у розділі ДФУ «Реактиви»; в окремих випадках приготування реактивів здійснювали за вимогами інших фармакопей, що зазначено у відповідних методиках. Реактиви використовували свіжоприготованими або протягом терміну придатності, зазначеного у відповідній нормативній документації (НД) [7].

Використовуване обладнання: ваги аналітичні «Mettler Toledo» моделі AB-204/A (Швейцарія); ваги аналітичні «Kern» моделі ABT 120-5DM (Німеччина); ваги аналітичні «Sartorius» (Німеччина); ультразвукова ванна «Sonorex» моделі «Super RK 103 H» (Німеччина); сушильна шафа електрична моделі «2Ш-0-01».

Для виготовлення модельних зразків ЛЗ використовували змішувач кубічний високошвидкісний «Farma test» (Німеччина).

Фасування в одnodозові пакети із буфлену здійснювали на автоматі фірми ТОВ «НВП ІНТА» (Україна).

Дослідження *фармакотехнологічних характеристик* порошку лікарського засобу виконували методом нерухомої лійки з використанням насадки діаметром $10 \pm 0,01$ мм (тест «Плинність») та вібраційного пристрою «Farma test» (Німеччина).

Насипну густину визначали на пристрої для визначення об'ємної маси типу PT-TD1 (Farma Test, Німеччина) (100,0 г).

Для потенціометричного визначення рН використовували рН-метр «Seven Easy» фірми «Mettler Toledo» (США).

Оцінювання сумісності компонентів лікарського засобу, кількісне визначення гліцину та глутамінової кислоти здійснювали методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях на двопроменевому спектрофотометрі Specord 200 «AnalytikJena» (Німеччина), вимірюючи оптичну густину в кюветах із шаром завтовшки 10 мм.

Ступінь гігроскопічності визначали у скляних бюксах із використанням ексикатора, заповненого насиченим розчином амонію хлориду Р.

Ідентифікацію гліцину, глутамінової кислоти, аскорбінової кислоти та сорбіту виконували методами ТШХ/ВЕТШХ із використанням такого обладнання та матеріалів:

Нерухома фаза. ТШХ-пластини: Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці; TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці; Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці; *ВЕТШХ-пластини:* HPTLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці.

Тип і конфігурація хроматографічних камер. Хроматографічні камери з розділювальним виступом фірми «Сорбфіл» (19×19,5×6,5 см) та «Camag®» (27×7×26 см).

Виявлення хроматографічних зон (дериватизація). Детектування хроматографічних зон здійснювали обприскуванням із пульверизатора розчином для виявлення та подальшим нагріванням у сушильній шафі електричній моделі «2Ш-0-01».

Нанесення зразків здійснювали із використанням мікрошприца Hamilton Bonaduz AG, Via Crusch 8, CH-7402 Switzerland об'ємом 10,0 мкл.

Документування хроматограм після їх виявлення виконували за допомогою візуалізатора Camag® TLC Visualizer 2 із використанням програмного забезпечення winCATS®.

Температура і вологість. Для одержання відтворюваних результатів проводили експеримент за температури 25 °С та відносної вологості повітря не більше 75 % [8, 72].

Ідентифікацію, кількісне визначення ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот та визначення супровідної домішки саліцилової кислоти здійснювали методом ВЕРХ на рідинному хроматографі ProStar фірми «VARIAN» (США) із використанням спектрофотометричного детектора ProStar 325 та спектрофотометричного діодно-матричного детектора ProStar 330. Під час розроблення методик використовували такі хроматографічні колонки:

– хроматографічна колонка Hydrosphere C18 фірми YMC розміром 150 × 4,6 мм з передколонкою з розміром частинок 3 мкм;

- хроматографічна колонка Symmetry C18 фірми Waters розміром $150 \times 4,6$ мм з передколонкою з розміром частинок 3.5 мкм;
- хроматографічна колонка Supelcosil LC-NH₂ фірми «Supelco» розміром $150 \times 4,6$ мм з передколонкою з розміром частинок 3 мкм.

2.3 Методи дослідження

З метою науково-практичного обґрунтування складу, технології та стандартизації ЛЗ для фармакотерапії алкогольної інтоксикації у формі порошку було використано сучасні фізичні, фізико-хімічні методи аналізу та фармакотехнологічні випробування, методи кількісного визначення, біологічні методи аналізу, статистичний аналіз результатів хімічного, технологічного та фармакологічного експериментів, валідацію аналітичних методик та випробувань, методи оцінювання екологічності аналітичних процедур.

2.3.1 Фізичні, фізико-хімічні методи дослідження, фармакотехнологічні випробування

Фізичні, фізико-хімічні методи дослідження, фармакотехнологічні випробування та методи кількісного визначення, використані під час дослідження: визначення ступеня гігроскопічності; потенціометричне визначення рН; визначення води напівмікрометодом (метод К. Фішера); ТШХ/ВЕТШХ; ВЕРХ; спектрофотометрія.

2.3.1.1 Визначення ступеня гігроскопічності речовин

Фармакотехнологічні властивості порошків перебувають у тісному взаємозв'язку із властивостями лікарських речовин, що входять до його складу. Якщо пружність пари в повітрі більша, ніж пружність на поверхні твердих

частинок, то порошкоподібна маса починає поглинати вологу з повітря і розпливатися в ній (гігроскопічність), що своєю чергою призводить до появи взаємодій між компонентами суміші, утворення нових сполук, а отже, до зміни властивостей порошків [82, 83].

Дослідження ступеня гігроскопічності як критичної характеристики важливе не лише для визначення оптимальних умов зберігання субстанції, а й на етапі виробництва готових ЛЗ, бо дозволяє уникнути небажаних взаємодій субстанцій, дібрати оптимальну технологію виготовлення ЛЗ та обґрунтувати використання тих чи інших допоміжних речовин [8, 82, 83].

Дослідження ступеня гігроскопічності вихідних АФІ та допоміжних речовин виконували згідно з вимогами статті ДФУ 5.11 «Розділ «властивості» у монографіях» [8, 72] за методикою:

Використовують зважену скляну посудину із зовнішнім діаметром 50 мм і заввишки 15 мм. Зважують посудину та кришку (m_1). Зазначену у випробуванні на втрату в масі під час висушування або на вміст води наважку випробовуваної субстанції поміщають у посудину та зважують (m_2). Посудину без кришки поміщають за температури 25°C в ексікатор з насиченим розчином амонію хлориду P і витримують протягом 24 год. Закривають посудину кришкою та зважують (m_3) [8, 72]. Збільшення в масі, у відсотках, обчислюють за формулою (2.10):

$$\frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (2.1)$$

2.3.1.2 Вивчення хімічної сумісності компонентів лікарського засобу, впливу кислотного і лужного середовища на активні фармацевтичні інгредієнти

Одним з етапів розроблення нових оригінальних ЛЗ є вивчення сумісності компонентів у комбінованих готових ЛФ. Між компонентами можливі різноманітні фізико-хімічні взаємодії, які проявляються на етапах виробництва і зберігання. Із цим можуть відбуватися зміни сипучості, розчинності, зовнішнього вигляду

препарату, накопичення продуктів деградації та взаємодії АФІ. Вивчення сумісності дозволяє оцінити наявність або відсутність суттєвої взаємодії між компонентами ЛЗ, яка могла б знизити ефективність та стабільність готових ЛЗ, та вжити коригувальних дій ще на етапі розроблення з метою запобігання таким взаємодіям [82, 83].

На підставі рекомендацій ІСН Q8 щодо системного підходу до фармацевтичної розробки ЛЗ необхідно оцінити сумісність АФІ з допоміжними речовинами, зазначеними в п. 3.2.Р.1 модуля 3 реєстраційного дос'є у форматі CTD (англ. *Common Technical Documentation*). Для препаратів, що містять більше одного АФІ, слід також оцінити сумісність між складовими компонентами [82, 83].

Сумісність компонентів ЛЗ досліджували методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях відповідно до вимог ДФУ 2.2.25 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій областях».

Приготування випробовуваних розчинів

Розчин гліцину. 0,010 г гліцину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують.

Розчин глютамінової кислоти (ГК). 0,010 г глютамінової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують.

Розчин ацетилсаліцилової кислоти (АСК). 0,012 г ацетилсаліцилової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують (вихідний розчин АСК). До 1,0 мл вихідного розчину АСК додають 5,0 мл води Р.

Розчин аскорбінової кислоти (АК). 0,0094 г аскорбінової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують (вихідний розчин АК). До 1,0 мл вихідного розчину АК додають 5,0 мл води Р.

Розчин фруктози. 0,040 г фруктози поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують.

Розчин сорбіту. 0,040 г сорбіту поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 води Р, доводять тим же розчинником до мітки й перемішують.

Для вивчення можливої взаємодії двокомпонентних розчинів з АФІ (АСК та АК): до 1,0 мл вихідного розчину АСК або АК додавали 5,0 мл будь-якого з перелічених розчинів гліцину, ГК, фруктози або сорбіту. Реєстрували УФ-спектр субстанцій спочатку окремо, а потім попарно в аналогічній концентрації.

Для визначення можливості реакції цукроамінної конденсації, що відбувається між амінокислотами та цукром, виконували дослідження як двокомпонентних систем (АК/гліцин, АК/ГК), так і повного складу з вмістом наповнювачів фруктоза, глюкоза, сахароза та сорбіт за температури 60 °С протягом 1 доби, результат оцінювали візуально за зміною забарвлення.

Можливі окислювально-відновні реакції (ОВР) серед компонентів ЛЗ визначали на підставі аналізу властивостей АФІ з огляду на будову молекули та відомих властивостей, описаних у науковій літературі.

2.3.1.3 Визначення фармакотехнологічних властивостей порошків

Оцінювання фізичних, хімічних і фармакотехнологічних властивостей лікарської субстанції зазвичай є першим кроком у розробленні твердої ЛФ, адже ці показники дозволяють прогнозувати проблеми, що можуть виникнути на етапах створення, дослідження і промислового виробництва препарату [82, 83].

Одним із найважливіших показників є плинність субстанції, що становить собою здатність порошкоподібного матеріалу сипатися під силою власного тяжіння та забезпечувати рівномірне заповнення матричного каналу. Разом з плинністю визначали кут природнього укусу. Плинність впливає на перебіг таких процесів, як транспортування, зберігання, змішування і пресування матеріалу та

залежить від низки показників: форми та розміру частинок, гранулометричного складу порошку, насипної густини до та після усадки. Серед інших фармакотехнологічних показників порошкоподібних лікарських форм важливим є визначення насипного об'єму, об'єму і густини після усадки тощо [1, 20].

Насипний об'єм (об'єм до усадки) – об'єм 100,0 г порошку, насипаного без ущільнення. Насипна густина (густина до усадки) – маса одиниці об'єму вільно насипаного порошку, залежить від густини та вологості речовини, форми та розміру частинок, їх укладання. За значенням насипної густини можна прогнозувати характер застосовуваних допоміжних речовин. Лікарські порошки зазвичай легкі, похибка вимірювання їх насипного об'єму вища, ніж у важких сипучих матеріалів. Тому визначають також об'єм та густину порошоків після усадки за механічного струшування. Різниця насипного об'єму порошку і об'єму після усадки свідчить про здатність матеріалу до усадки [1, 20].

Фармакотехнологічні властивості порошоків ЛЗ вивчали за уніфікованими методиками відповідно до вимог ДФУ 2.9.34, 2.9.36. Плинність визначали методом нерухомої лійки. Такі показники, як насипний об'єм – об'єм до усадки (V_0 , мл), об'єми після усадки (V_{10} , мл; V_{500} , мл; V_{1250} , мл) використовували для розрахування здатності порошку до усадки ($V_{10}-V_{500}$, мл), насипної густини (m/V_0 , г/мл) та густини після усадки (m/V_{1250} , г/мл) [8, 9].

Насипна густина (густина до та після усадки) – об'єм 100,0 г порошку, насипаного без ущільнення. Цей показник визначають на приладі, який складається: з градуйованого циліндра місткістю 250 мл із ціною поділки 2 мл; струшувального пристрою, який забезпечує 250 ± 15 зіскоків циліндра за хвилину з висоти ($3 \pm 0,2$) мм; підставки з тримачем для циліндра. У сухий циліндр поміщають без ущільнення 100,0 г випробовуваного матеріалу. Якщо це неможливо, беруть наважку випробовуваного матеріалу, що має насипний об'єм у діапазоні від 50 до 250 мл. Закріплюють циліндр на підставці та фіксують насипний об'єм до усадки (V_0). Проводять 10, 500, 1250 зіскоків циліндра та фіксують об'єми (V_{10} , V_{500} , V_{1250}) з точністю до найближчої позначки. Якщо різниця між V_{500} і V_{1250}

перевищує 2 мл, здійснюють ще 1250 зіскоків циліндра. Здатність порошку до усадки визначають як різницю між V_{10} і V_{500} [8, 9].

2.3.1.4 Визначення органолептичних (смакових) властивостей лікарського засобу

Смак – це складний комплекс відчуттів, зумовлений хімічними, фізико-хімічними властивостями речовин, умовами їх вживання та загальним станом організму [11]. Саме створення сучасних препаратів у раціональній ЛФ з оптимальними смаковими характеристиками є одним зі шляхів підвищення їх конкурентоспроможності [13].

На сьогодні одним із способів виправлення і маскування смаку ЛЗ є додавання коригентів, які, маючи більш сильні смакові імпульси, пригнічують небажаний смак окремих компонентів або поліпшують смакові якості фармацевтичних композицій [13]. Для аналізу сили й характеру відчуттів у разі додавання коригентів найбільш часто використовують методи органолептичної оцінки, що полягають у визначенні числового індексу смаку, який своєю чергою свідчить про кращу маскувальну силу середовища [11].

У межах дослідження смакових характеристик розробленого лікарського препарату використовували органолептичний метод оцінки коригентів смаку (запропонований А. І. Тенцовою), що полягає у розмежуванні інтенсивності сприйняття відчуттів і емоцій під час аналізу [1, 20]. Методика дослідження: вміст пакетів розчиняли у 200 мл гарячої води P та оцінювали смак розчину за п'ятибальною системою. Із одержаних даних виводили індекс смаку як середнє арифметичне значення від свідчень осіб, які брали участь у випробуванні. Щобільше значення числового індексу, то вищий маскувальний потенціал коригенту [1, 11, 20].

2.3.1.5 Ідентифікація та визначення чистоти речовин методами тонкошарової та високоефективної тонкошарової хроматографії

Метод ТШХ – зручний та широко застосовуваний хроматографічний метод аналізу, який використовують для ідентифікації і визначення чистоти як субстанцій, так і готових ЛФ. Наразі для розробки сучасних методик контролю якості лікарських засобів також рекомендовано застосовувати метод ВЕТШХ, який за рахунок використання тоншого шару сорбенту нерухомої фази із меншим розміром частинок (зазвичай не більше 2-10 мкм) дозволяє збільшити ефективність розділення хроматографічних зон та загалом чутливість визначення [35, 128, 161, 174].

Дослідження виконували відповідно до вимог ЄФ/ДФУ, 2.2.27 «Тонкошарова хроматографія» [8, 72]. Розділювальну здатність нерухомої фази для ідентифікації перевіряли за вимогами ЄФ/ДФУ, 4.1.1 [8, 72]. Перед використанням пластини активували, нагріваючи в сушильній шафі електричній (модель «2Ш-0-01») за температури 120 °С протягом 20 хв, для видалення залишкової вологи, яка може знизити активність сорбенту [8, 72].

Методика ідентифікації та визначення чистоти глютамінової кислоти, гліцину й аскорбінової кислоти методами ТШХ/ВЕТШХ

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин (а): 200 мг порошку із пакету № 1, що еквівалентно 25 мг глютамінової кислоти та 5 мг аскорбінової кислоти, поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 15 мл *води Р* при нагріванні на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [17, 138].

Випробовуваний розчин (b): 130 мг порошку із пакету № 2, що еквівалентно 10 мг гліцину, поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 15 мл *води Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [17, 138].

Випробовуваний розчин (с): 4000 мг порошку із пакету № 1, що еквівалентно 500 мг глютамінової кислоти та 100 мг аскорбінової кислоти, поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють у 20 мл води *P* при нагріванні на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину водою *P* і перемішують [17, 138].

Випробовуваний розчин (d): 3333 мг порошку із пакету № 2, що еквівалентно 25 мг гліцину, поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 15 мл води *P*, доводять об'єм розчину водою *P* і перемішують [17, 138].

Розчин порівняння (a): 25 мг стандартного зразку (СЗ) глютамінової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 10 мл води *P* при нагріванні на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину водою *P* до мітки й перемішують [17, 138].

Розчин порівняння (b). 10 мг СЗ гліцину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 10 мл води *P*, доводять об'єм розчину водою *P* і перемішують [17, 138].

Розчин порівняння (c). 5 мг СЗ аскорбінової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 10 мл води *P*, доводять об'єм розчину водою *P* і перемішують [17, 138].

Розчин порівняння (d). 25 мг СЗ глютамінової кислоти, 10 мг СЗ гліцину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 10 мл води *P* при нагріванні на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину водою *P* до мітки й перемішують [17, 138].

Розчин порівняння (e): 1 мл випробовуваного розчину (a) доводять водою *P* до мітки 200 мл [17, 138].

Розчин порівняння (f): 1 мл випробовуваного розчину (b) доводять водою *P* до мітки 200 мл [17, 138].

Пластика із шаром силікагелю P.

Рухома фаза: етанол (96 %) P – вода P (70:30).

Об'єм проб: 5 мкл (2 мкл).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см (7 см).

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують нінгідрину розчином *PI* і витримують за температури від 100 °C до 105 °C протягом 5 хвилин.

Розрахунок критеріїв. Коефіцієнт утримування (R_f), ΔR_f , ступеня розділення (R_s), селективності розділення (α) розраховували за формулами (2.2-2.5) [8, 17, 72, 138]:

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (2.2)$$

$$\Delta R_f = R_{f1} - R_{f2} \quad (2.3)$$

$$R_s = \Delta X / \left[\frac{(W_1 + W_2)}{2} \right] \quad (2.4)$$

$$\alpha = \frac{\left(\frac{1}{R_{f2}} - 1 \right)}{\left(\frac{1}{R_{f1}} - 1 \right)} \quad (2.5)$$

де l – відстань від центра хроматографічної зони до лінії «старт», мм;

L – відстань фронту розчинника, мм;

ΔX – відстань між центрами хроматографічних зон, мм;

W – висота хроматографічної зони, мм.

Ефективність розділення визначали за кількістю теоретичних тарілок (N) та їхньою висотою (H) за формулами (2.6-2.7) [8, 17, 72, 138]:

$$N = 16 \left(\frac{L \cdot R_f}{W} \right)^2 \quad (2.6)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.7)$$

Методика ідентифікації сорбіту методом ТШХ

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин (а). 170 мг порошку із саше-пакета № 1, що еквівалентно 100,9 мг сорбіту, поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 10 мл *води P* та нагрівають на ультразвуковій бані за температури 60 °C протягом 15 хв, охолоджують. Доводять об'єм розчину *водою P* до мітки й перемішують [7, 72].

Випробовуваний розчин (b). 140 мг порошку із саше-пакета № 2, що еквівалентно 101,5 мг сорбіту, поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 10 мл води *P*, доводять об'єм розчину водою *P* до мітки й перемішують [7, 72].

Розчин порівняння. 100 мг СЗ сорбіту поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 10 мл води *P*, доводять об'єм розчину водою *P* до мітки й перемішують [7, 72].

Пластинка із шаром силікагелю P.

Рухома фаза: вода *P* – етилацетат *P* – пропанол *P* (10:20:70).

Об'єм проб: 2,5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: пластину обприскують 4-амінобензойної кислоти розчином *P*, висушують у потоці холодного повітря, нагрівають за температури 100 °С протягом 15 хв, охолоджують. Далі пластину обприскують 2 г/л розчином натрію перйодату *P*, висушують у потоці холодного повітря, нагрівають за температури 100 °С протягом 15 хв [7, 72].

Результати: на хроматограмі випробовуваних розчинів (*a*, *b*) мають виявитися хроматографічні зони на рівні зони на хроматограмі розчину порівняння [7, 72].

2.3.1.6 Кількісне визначення амінокислот методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях

За своїми фізико-хімічними властивостями амінокислоти становлять собою складний об'єкт для дослідження спекрофотометричними методами, бо слабо поглинають УФ- і видиме світло, не мають сильної власної флуоресценції, електроактивних груп, а чутливість їх визначення не є висока. Однак сьогодні, щоб кількісно визначити певні амінокислоти, особливо в рутинному аналізі, широко

застосовують метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях після їх хімічної дериватизації. За допомогою цього процесу амінокислоти трансформуються у сполуки, які містять групу-хромофор, що уможливорює їх аналіз спектрофотометричними методами, а також підвищує чутливість визначення. Для аналізу амінокислот використовують методи, що ґрунтуються на здатності продуктів взаємодії амінокислот з нінгідрином поглинати у видимій області спектра [35, 140, 141, 161, 174].

Кількісне визначення гліцину та ГК здійснювали методом спектрофотометрії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.25 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій областях» [8, 72].

Методика кількісного визначення гліцину

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин. Близько 4,00 г порошку препарату з пакета № 2 поміщають у мірну колбу місткістю 250,0 мл, додають 150 мл води *P*, розчиняють у воді *P*, доводять тим самим розчинником до мітки й перемішують. 2,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, доводять *P* водою до мітки й перемішують [140, 141].

2,0 мл отриманого розчину поміщають у конічну колбу місткістю 100 мл, додають 4,0 мл буферного розчину *pH* 6,8 *P*, 2,0 мл 1 % розчину нінгідрину в етанолі (96 %) *P* і 2,0 мл 0,05 % водного розчину аскорбінової кислоти [140, 141].

Розчин порівняння. Близько 0,030 г *СЗ гліцину* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 70 мл води *P*, доводять тим самим розчинником до мітки й перемішують. 10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводять водою *P* до мітки та перемішують [140, 141].

2,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 4,0 мл буферного розчину *pH* 6,8 *P*, 2,0 мл 1 % розчину нінгідрину в етанолі (96 %) *P* і 2,0 мл 0,5 % водного розчину аскорбінової кислоти [140, 141].

Колби з вмістом випробовуваного розчину і розчину порівняння нагрівають одночасно в киплячій водянній бані впродовж 30 хв, потім швидко охолоджують під струменем холодної води й об'єм розчину доводять *P* водою до мітки [140, 141].

Компенсаційний розчин. 2,0 мл *P* води поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 4,0 мл *буферного розчину рН 6,8 P*, 2 мл 1 % розчину нінгідрину в етанолі (96%) *P* і 2,0 мл 0,05 % водного розчину аскорбінової кислоти [140, 141].

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину й розчину порівняння на спектрофотометрі в максимумі за довжини хвилі 569 нм, використовуючи компенсаційний розчин [140, 141].

Вміст гліцину в одному пакеті, в грамах, розраховують за формулою (2.8):

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 2 \cdot 250 \cdot 20 \cdot 100 \cdot P \cdot b}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 100} = \frac{A \cdot m_0 \cdot P \cdot b}{A_0 \cdot m \cdot 10} \quad (2.8)$$

де *A* – оптична густина *випробовуваного розчину*;

*A*₀ – оптична густина *розчину порівняння*;

*m*₀ – маса наважки *СЗ гліцину*, взята для приготування *розчину порівняння*, у грамах;

m – маса наважки порошку препарату, взята для приготування *випробовуваного розчину*, у грамах;

P – вміст основної речовини в *СЗ гліцину*, зазначений у сертифікаті якості, у відсотках;

b – середня маса вмісту пакета, у грамах.

Методика кількісного визначення глутамінової кислоти

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин: 4,000 г порошку препарату із пакета №1 поміщають у мірну колбу місткістю 250,0 мл, додають 150 мл *води P*, розчиняють у *воді P* і доводять тим самим розчинником до позначки та перемішують. 2,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводять *водою P* до позначки та перемішують. До 5,0 мл отриманого розчину в колбі місткістю 100,0 мл додають

10 мл буферного розчину рН 6,8, 5 мл 1% розчину нінгідрину в спирті 96% Р, нагрівають на киплячій водяній бані впродовж 30 хв, потім швидко охолоджують у струмені холодної води й доводять об'єм розчину до позначки.

Розчин порівняння: 0,050 г СЗ глютамінової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняють у 20 мл води Р, доводять тим самим розчинником до позначки та перемішують. 2,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводять водою Р до позначки та перемішують. До 5,0 мл отриманого розчину в мірній колбі на 100,0 мл додають 10 мл буферного розчину рН 6,8, 5 мл 1% розчину нінгідрину в спирті 96% Р, нагрівають на киплячій водяній бані впродовж 30 хв, потім швидко охолоджують у струмені холодної води й доводять об'єм розчину до позначки.

Компенсаційний розчин. 5 мл води Р поміщають у мірну колбу на 100,0 мл, додають 10 мл буферного розчину з рН 6,8, 5 мл 1% розчину нінгідрину в спирті 96% Р і доводять об'єм розчину водою до мітки.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння в максимумі за довжини хвилі 567 нм проти компенсаційного розчину.

Вміст глютамінової кислоти в одному пакеті (Х), у міліграмах, розраховують за формулою (2.9):

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 250,0 \cdot 2,0 \cdot 25,0 \cdot 100,0 \cdot 5,0 \cdot P \cdot b}{A_0 \cdot m \cdot 25,0 \cdot 2,0 \cdot 25,0 \cdot 5,0 \cdot 100,0 \cdot 100} = \frac{A \cdot m_0 \cdot P \cdot b}{A_0 \cdot m \cdot 10}, \quad (2.9)$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_0 – маса наважки СЗ глютамінової кислоти, взята для приготування розчину порівняння, у міліграмах;

m – маса наважки порошку, взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах;

Р – вміст основної речовини у СЗ глютамінової кислоти, зазначений у сертифікаті якості, у відсотках;

b – середня маса вмісту пакета, у грамах.

2.3.1.7 Ідентифікація і кількісне визначення ацетилсаліцилової та аскорбінової кислот, визначення домішки саліцилової кислоти методом рідинної хроматографії

Одним із сучасних, універсальних, високочутливих і специфічних методів аналізу, що дозволяє одночасно проводити ідентифікацію, кількісне визначення та здійснювати контроль за вмістом декількох АФІ і можливих домішок, є метод ВЕРХ. Особливо важливим є застосування цього методу для контролю якості багатокомпонентних ЛЗ, бо одночасне визначення декількох показників дозволяє скоротити загальну тривалість аналізу, його собівартість, забезпечуючи разом із цим високу точність і відтворюваність результатів вимірювання [39, 136].

Випробування здійснювали методом ВЕРХ відповідно до вимог ДФУ, 2.2.29 «Рідинна хроматографія» [8, 72].

Хроматографували за таких умов:

- хроматографічні колонки (зазначено в розділі 2.2);
- швидкість рухомої фази – 1,2 мл/хв;
- температура колонки – 45 °С;
- детектування за довжини хвилі – 240 нм;
- об'єм інжекції – 20 мкл;
- рухома фаза: *буферний розчин рН 3,2 – ацетонітрил Р (80:20),* дегазована будь-яким зручним способом;
- режим елюювання – ізократичний;
- час хроматографування – 10 хв [143, 144].

Приготування буферного розчину рН 3,2. 1,00 г калію дигідрофосфату Р поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 950 мл води Р та доводять до рН $3,2 \pm 0,05$ кислотою фосфорною розведеною Р, доводять об'єм водою Р до позначки та перемішують [8, 72, 143, 144].

Методика кількісного визначення АК та АСК

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин. 4,000 г (точна наважка) вмісту саше-пакета № 1 поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 40 мл *ацетонітрилу Р* та струшують протягом хвилини, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки, перемішують і фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка». 10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 250,0 мл, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки та перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (а). 100,0 мг (точна наважка) ЕР CRS АК поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 70 мл 20 % розчину *ацетонітрилу Р*, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки й перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (b). 65,0 мг (точна наважка) ЕР CRS АСК поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 75 мл 20 % розчину *ацетонітрилу Р*, доводять тим самим розчинником до мітки й перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (с). 10,0 мл *розчину порівняння (b)* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 2,0 мл *розчину порівняння (а)*, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки й перемішують [143, 144].

Розчини використовують свіжоприготовані.

Перед хроматографуванням випробовувані розчини та розчини порівняння фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм [143, 144].

Розрахунок кількісного вмісту. Вміст АК (X_1) в одному саше-пакеті, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту саше, обчислюють за формулою (2.10):

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_0 \times 200 \times 250 \times 2 \times P \times b}{S_0 \times m \times 10 \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times b}{S_0 \times m \times 100}, \quad (2.10)$$

де: S_1 – середнє значення площ піків АК, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків АК, розраховане з хроматограм розчину порівняння (с);

m – маса наважки саше-пакета № 1, взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах;

m_0 – маса наважки EP CRS АК, взята для приготування розчину порівняння (а), у міліграмах;

P – вміст основної речовини у EP CRS АК, взята для приготування розчину порівняння (а), у відсотках.

b – середня маса вмісту пакета, у міліграмах.

Вміст АСК (X_2) в одному пакеті, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту саше-пакета, обчислюють за формулою (2.11):

$$X_2 = \frac{S_1 \times m_0 \times 10 \times 250 \times 200 \times P \times b}{S_0 \times m \times 10 \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times b}{S_0 \times m \times 20}, \quad (2.11)$$

де S_1 – середнє значення площ піків АСК, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків АСК, розраховане з хроматограм розчину порівняння (с);

m – маса наважки саше-пакета № 1, взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах;

m_0 – маса наважки EP CRS АСК, взята для приготування розчину порівняння (а), у міліграмах;

P – вміст основної речовини у EP CRS АСК, взята для приготування розчину порівняння (а), у відсотках.

b – середня маса вмісту саше-пакета, у міліграмах.

Методика визначення супровідних домішок (саліцилової кислоти)

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин. 4,000 г (точна наважка) вмісту саше-пакета № 1 поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 40 мл *ацетонітрилу* P та струшують протягом хвилини, доводять об'єм розчину *водою* P до позначки, перемішують і фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка». 10,0 мл

одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводять об'єм розчину водою *P* та перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (а). 13,0 мг (точна наважка) EP CRS СК поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, розчиняють в 4 мл *ацетонітрилу P*, доводять об'єм водою *P* до мітки та перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (b). 1,0 мл розчину порівняння (а) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм водою *P* до мітки та перемішують [143, 144].

Розчин порівняння (с). 1,0 мл розчину порівняння (b) поміщають у мірну колбу місткістю 10,0 мл, доводять водою *P* до мітки та перемішують [143, 144].

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 1,0 мл випробовуваного розчину та 1,0 мл розчину порівняння (а) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм водою *P* до мітки та перемішують [143, 144].

Розчини використовують свіжоприготовані.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм [143, 144].

Хроматографування виконують в умовах методики «Кількісне визначення АК та АСК».

Хроматографують розчин для перевірки придатності хроматографічної системи, розчин порівняння (с), розчин порівняння (b) та випробовуваний розчин не менше 3 разів.

2.3.2 Біологічні методи аналізу

2.3.2.1 Фармакологічні дослідження

Дослідження *in vivo* проводили, використовуючи модель алкогольного гепатиту [10], або жирового гепатозу, за іншими авторами, який відтворювали щоденною інтоксикацією щурів водним 40 % розчином етанолу в дозі 7 мл/кг протягом 1 тижня за внутрішньошлункового введення [10]. Експеримент виконували на 35 аутбредних самцях щурів масою 190-210 г. Тварин розподіляли

на 5 експериментальних груп (рандомізували по групах методом мінімізації різниці за масою) [142]:

- інтактний контроль – здорові тварини, у яких не відтворювали модельну патологію і які отримували розчинник (ІК);
- контрольна патологія – тварини, у яких відтворювали модельну патологію і які отримували розчинник (КП);
- тестова група – тварини, у яких відтворювали модельну патологію і які отримували досліджуваний тест-зразок (ТЗ-ПП);
- референтна група 1 – тварини, у яких відтворювали модельну патологію і які отримували референс-зразок Глутаргін Алкоклін® (РЗ-ГА);
- референтна група 2 – тварини, у яких відтворювали модельну патологію і які отримували референс-зразок Медихронал®-Дарниця (РЗ-МД).

Подану науково-дослідну роботу регламентовано вимогами нормативних документів, вона є частиною комплексу доклінічних досліджень, необхідних для державної реєстрації. Дослідження виконано відповідно до методичних рекомендацій і Наказів МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. та № 95 від 16.02.2009 р. та з дотриманням вимог Належної лабораторної практики (GLP) [12, 15, 142].

Дослідження проведено відповідно до закону України «Про лікарські засоби» та згідно з вимогами Державного експертного центру Міністерства охорони здоров'я України щодо доклінічних досліджень з урахуванням положень Директиви Європейського Парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» [64, 142] (Протокол комісії з біоетики НФаУ № 5 від 25.03.2021 р.).

Тварин утримували у віварії Навчально-наукової тренінгової лабораторії медико-біологічних досліджень (ННТЛМБД) НФаУ в окремій кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату: температура повітря 20-24 °С, відносна вологість повітря 45-65 %, світловий режим «12 годин день/ніч», у полімерних клітинах, по 2-3 тварини в клітці. Тварини мали вільний доступ до води

та їжі *ad libitum*. Доглядали за тваринами відповідно до загальноприйнятих локальних та ARRIVE рекомендацій, узгоджених зі стандартними операційними процедурами ННТЛМБД НФаУ [16, 85, 142].

Всі досліджувані зразки та розчинник вводили внутрішньошлунково через 1 год після надходження розчину етанолу протягом 7 днів у нижчезазначених дозах (табл. 2.1). Через 72 години після останнього введення етанолу тварин виводили з експерименту шляхом евтаназії в CO₂-боксі. У піддослідних тварин відбирали кров для отримання сироватки, проводили лапаротомію і хірургічно вилучали фрагменти печінки для подальшої гомогенізації та отримання супернатанту [10, 142].

Як референтні зразки використовували комерційні ЛЗ Глутаргін Алкоклін (ТОВ «ФК «Здоров'я»», Україна, РП №, UA/4022/02/02) та Медихронал®-Дарниця (ПрАТ «ФФ «Дарниця»», Україна, РП № UA/6504/01/01, UA/6504/01/01) [142].

Дози досліджуваних зразків, еквівалентні для тварин, розраховували з огляду на разову терапевтичну дозу засобу з урахуванням міжвидових відмінностей маси та площі поверхні тіла [10]. Через те що деякі з досліджуваних засобів є комбінованими, а всі їх використовують для отримання орального розчину, перерахунок доз здійснювали, зважаючи на масу ЛЗ, з якого далі й готували розчин. В інструкціях до застосування засобів зазначено, що у звичайному лікувально-профілактичному режимі мінімальна добова доза становить разову і відповідає 1-й одиниці дозування, тому в обох експериментальних моделях досліджували саме її. Дози, отримані в процесі розрахування, наведено в табл. 2.1 [10, 111, 142].

Таблиця 2.1

Еквівалентні для тварин дози досліджуваних зразків

Досліджуваний зразок	Разова доза для дорослої людини	Перерахована доза для експериментальних тварин (щурів)
ТЗ-ПП	12,0 г	1,24 г/кг
Глутаргін Алкоклін®	3,0 г	0,31 г/кг
Медихронал®-Дарниця	28,5 г	2,95 г/кг

Досліджувані зразки розчиняли в необхідній кількості теплої води і вводили тваринам внутрішньошлунково за допомогою спеціального металевого ентерального зонда. Лімітувальним став максимальний об'єм рідини, використаний для розчинення Медихронал®-Дарниця – 200 мл на одиницю дозування (відповідно до інструкції). Об'єми отриманих для введення тваринам розчинів не перевищували максимально допускний об'єм для цього шляху введення і цього виду лабораторних тварин. Для відтворення рівних умов експерименту тварини групи інтактного контролю та контрольної патології отримували еквівалентну кількість розчинника в тому ж самому режимі [10, 111, 142].

Верифікацію гепатопротекторної активності здійснювали, оцінюючи біохімічні показники. Активність аланінамінотрансферази (АлАТ) в сироватці крові визначали за допомогою стандартного набору реагентів «BIO-LA-TEST® амінотрансфераза АлАТ (ALT 360)» (Erba Lachema s.r.o., Чехія), загальний білок – у сироватці крові за допомогою стандартного набору реагентів «Загальний білок HP010.01» (Філісіт-Діагностика, Україна). Дослідження з сироваткою крові виконували на напіваавтоматичному біохімічному аналізаторі MAP-LAB plus® (Biochemical Systems International S.r.l., Італія) згідно з відповідними інструкціями [68, 142].

Відновлений глутатіон (ВГ) у супернатанті гомогенату тканин печінки визначали спектрофотометрично за стандартною методикою з реактивом Елмана за оптичною густиною утвореного салатового забарвлення за довжини хвилі 412 нм. Вміст відновленого глутатіону обчислювали за формулою (2.12) [68, 142]:

$$C = A \text{ зразка} * 1094 \text{ мг\% (умовні одиниці)}, \quad (2.12)$$

де С – концентрація відновленого глутатіону;

А зразка – оптична густина дослідної проби.

ТБК-активні продукти (ТБК-АП) визначали спектрофотометрично за стандартним методом за реакцією з тіобарбітуровою кислотою проти контрольної проби за довжини хвилі 532 нм [68, 142]. Вміст ТБК- реактантів у гомогенаті

визначали за формулою (2.13) з урахуванням гомогенізації тканин у буфері та отримання супернатанту:

$$C = (A \text{ зразка} * 200 * 10^6) / (1,56 * 10^5) \text{ (мкмоль/г)}, \quad (2.13)$$

де C – концентрація ТБК-активних продуктів; A зразка – оптична густина дослідної проби.

Експериментальні дані обробляли, використовуючи стандартний пакет програм «Statistica 6.0» із розрахунком середнього значення (M), стандартної похибки середнього ($\pm m$) та довірчого інтервалу (p) за допомогою дисперсійного аналізу алгоритмом ANOVA. Відмінності між групами вважали статистично значущими за $p < 0,05$. Перевірку вибірок на нормальність і порівняльний апостеріорний аналіз здійснювали в рамках алгоритму програми [68, 142].

2.3.2.2 Мікробіологічні випробовування

Згідно з методами, наведеними в ДФУ, 2.6.12 «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів» та 2.6.13 «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів», було проведено випробування мікробіологічної чистоти порошку шипучого для приготування орального розчину [8, 72].

Відповідно до ст. 5.1.4 «Мікробіологічна чистота нестерильних фармацевтичних препаратів та субстанцій для фармацевтичного застосування» ДФУ 2.4 для неводних ЛЗ для орального застосування критерії прийнятності базуються на загальній кількості аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та загальній кількості дріжджових і плісневих грибів (ТУМС). Для визначення загальної кількості аеробних мікроорганізмів використовували соєво-казеїновий агар, для визначення загальної кількості дріжджових і плісневих грибів – Сабуро-декстрозний агар, для випробування на наявність *Escherichia coli* – соєво-казеїновий бульйон [8, 72].

Перед дослідженням виконували випробування на відповідність ростових властивостей живильних середовищ. Живильні середовища інокулювали невеликою кількістю відповідних тест-штамів мікроорганізмів (10–102 КУО/мл). Для тестування використовували робочі суспензії мікроорганізмів відповідно до вимог ДФУ, які вирощували кожний окремо на відповідному середовищі. Як тест-штами використовували: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Усі культури мікроорганізмів, що вирости на відповідному середовищі, відповідали таксономічному штаму, морфологія колоній за культивування на середовищах і морфологія клітин за мікроскопії були типовими, а власне середовища відповідали вимогам на стерильність – зростання мікроорганізмів відсутнє, середовище прозоре. Тобто живильні середовища відповідали за ростовими, інгібіторними, індикативними властивостями вимогам ДФУ і витримували випробування на стерильність [8, 72].

Використовували методики ст. 2.6.12 та 2.6.13, придатність яких було доведено. Кількісне визначення КУО тест-мікроорганізмів у суспензіях здійснювали методом висівання у чашки Петрі із соєво-казеїновим агаром для ТАМС та із Сабуро-декстрозним агаром для ТУМС. Для верифікації умов випробування проводили негативний контрольний дослід, використовуючи для висівання у живильні середовища стерильний розчинник. Інкубували посіви згідно з вимогами ДФУ, 2.6.12, підраховували кількість колоній на кожній чашці Петрі, визначали середнє арифметичне значення кількості колоній. Дослідження проводили на трьох серіях (по п'ять зразків у кожній) [8, 72].

2.3.3 Статистичний аналіз результатів експерименту

Одержані результати статистично обробляли відповідно до вимог загальної статті ДФУ, 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту^N», використовуючи програмне забезпечення Microsoft Excel 2019 [8, 72].

2.3.4 Валідація аналітичних методик і випробувань

У рамках дисертаційного дослідження для розроблених методик контролю якості було визначено валідаційні характеристики методик відповідно до вимог ДФУ, 5.3.N.2. «Валідація аналітичних методик і випробувань», рекомендацій науковців у цій галузі [8] і з використанням програмного забезпечення статистичного аналізу SAS/STAT (SAS – Statistical Analysis Software (https://www.sas.com/en_us/software/stat.html)).

Для методик ідентифікації субстанцій методом ТШХ було вивчено такі валідаційні показники, як специфічність, робасність, прецизійність та внутрішньолaboratorна прецизійність. Для методик визначення кількісного вмісту досліджено такі валідаційні характеристики, як діапазон застосування, лінійність, специфічність, правильність, прецизійність (зокрема і внутрішньолaboratorна прецизійність), робасність [3, 8, 72].

2.3.5 Оцінка екологічності аналітичних процедур

Важливо, добираючи розчинник, оцінити його екологічність. У науковій літературі існують численні рекомендації щодо вибору розчинників з урахуванням їх впливу на навколишнє середовище, стабільність, горючість та вибухонебезпечність. Проте використання критеріїв оцінювання екологічності вимагає спеціальних інструментів, які дозволять отримати легко інтерпретований та інформативний результат, особливо під час порівняння методик аналізу. З цією метою використовують аналітичний калькулятор GREEnness, критерії оцінки якого взято з дванадцяти принципів «зеленої хімії» і трансформовано в уніфіковану шкалу 0-1. Підсумковий бал розраховують на основі принципів важливості, який представляє собою добуток результатів оцінювання за кожним критерієм. Результатом є піктограма, що демонструє остаточну оцінку, ефективність аналітичної процедури за кожним показником, у якій значущість кожного принципу відображається шириною його відповідного сегмента. Оцінку

результатів можна легко виконати за допомогою зручного програмного забезпечення з автоматично створеним, а одержану піктограму зручно використовувати як для розроблення нової «зеленої» методики аналізу, так і для її порівняння з тими методами, що існують наразі [138, 161].

Для оцінювання екологічності аналітичних процедур використовували програмне забезпечення «Analytical GREEnness Metric Approach», що є у відкритому доступі та яке було завантажено із сайту <https://mostwiedzy.pl/wojciech-wojnowski,174235-1/AGREE>.

Висновки до розділу II

1. Наведено опис АФІ й допоміжних речовин, методики фармакотехнологічних, фізико-хімічних, фармакологічних і мікробіологічних досліджень, умови їх проведення, необхідні для розробки оптимального складу та раціональної технології порошку шипучого для приготування орального розчину.

2. Наведено методики контролю якості ЛЗ, що охоплюють ідентифікацію, випробування на чистоту і кількісне визначення діючих речовин нового ЛЗ, вимоги до визначення валідаційних характеристик.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

1. Rudakova O., Gubar, S., Smielova N., Yaremenko M., Bevz N., Georgiyants V. Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 2 (36). P. 81–89. (Scopus). DOI: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.25585>

2. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Lytkin D., Briukhanova T., Bezchasnyuk E., Bevz N., Georgiyants V. Study of compatibility of components of a new combined drug for treatment of alcoholic intoxication and its hepatoprotective effect on a model of alcoholic liver injury. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 6 (34). P. 91–100. (Scopus) DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.249880>

3. Rudakova O. V., Gubar S. M., Bezchasnyuk O. M., Bevz N. Y., Smielova N. M., Georgiyants V. A. Розробка складу та технології комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 1. С. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721>

4. Selection of “green” conditions for identifying components in a combined medicine by TLC/HPTLC methods / O. V. Rudakova, S. M. Gubar, N. M. Smielova, A. I. Kriukova, N. Yu. Bevz, V. A. Georgiyants // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії* 2022, 20 (2). С. 52-63. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.259691>

5. Rudakova O., Gubar S., Kriukova, A., Smielova N., Bezchasnyuk E. Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. № 5 (21). P. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294>

РОЗДІЛ III

РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ КОМБІНОВАНОГО ОРИГІНАЛЬНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СИМПТОМІВ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ВИВЧЕННЯ ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Новий комбінований оригінальний ЛЗ для фармацевтичної корекції алкогольної інтоксикації розробляли на підставі результатів вивчення хімічної сумісності АФІ й допоміжних речовин та дослідження гепатопротекторного ефекту на тлі алкогольного гепатиту в щурів.

Основними етапами фармакотехнологічних і фармакологічних досліджень стали:

- обґрунтування вибору АФІ для введення у ЛЗ з огляду на симптоми алкогольної інтоксикації;
- фармакологічне дослідження композиції на стандартній експериментальній моделі алкогольного ураження печінки;
- визначення фізичних, фізико-хімічних критеріїв і характеристик індивідуальних речовин та їх сумішей для оцінювання сумісності компонентів;
- виявлення тих поєднань компонентів, що викликають відхилення за фізичними та фізико-хімічними критеріями;
- порівняльний аналіз і визначення причин відхилення критеріїв сумісності компонентів від очікуваних;
- розроблення рекомендації щодо запобігання проблемам під час виробництва та зберігання ЛЗ, пов'язаним з несумісністю компонентів;
- технологічна схема виготовлення ЛЗ.

3.1 Обґрунтування вибору АФІ для введення у фармакологічний засіб з огляду на симптоми алкогольної інтоксикації

На тлі вживання алкоголю окислення субстратів, які в нормі беруть участь в енергетичному метаболізмі, знижується, щоб пристосуватися до утилізації етанолу й продуктів його обміну. Після відміни алкоголю тканинам мозку потрібен час, щоб зворотно адаптуватися до окиснення типових енергетичних субстратів. Тож надання нервовій системі легкоокиснювальних енергетичних субстратів, таких, як гліцин, є однією з ефективних стратегій фармакокорекції похмільного синдрому [28, 52].

У печінці продукти обміну амінокислот стають субстратами для глюконеогенезу, що в подальшому надає можливість забезпечити мозок глюкозою [28]. У клітинах головного мозку окиснювальне дезамінування гліцину та глутамату здатні відновлювати пул пірвіноградної та α -кетоглутарової кислоти, що будуть долучатися до циклу лимонної кислоти для забезпечення головного мозку енергією. Із цим надлишок глутамінової кислоти в цьому засобі сприятиме знешкодженню утвореного в нейронах амоніаку та, перетворюючись на глутамін, надходить до печінки для подальшого знешкодження, через що активність ферментів циклу лимонної кислоти не буде інгібуватися, а надлишковий амоніак не буде зворотно акцептований на α -кетоглутарову кислоту. ГК є прекурсором для ГАМК та під час вивільнення стимулює відповідні рецептори [52].

Метаболізм етанолу спричинює виснаження пулу відновлених цитоплазматичного НАДФ та ітрамітохондріального НАД [74]. Із цим зменшується кількість відновленого глутатіону, який вже не може бути активно залучений до перетворення докозагексаєнової кислоти на вітамін С, що призводить до посталкогольного оксидативного стресу клітин головного мозку. Отже, виснаження глутатіону зумовлює посилення і продовження похмілля. Крім того, АК в нормі запобігає утворенню кон'югатів катехол-білок із нейротоксичного окисленого дофаміну, який блокує рецептори дофаміну та спричиняє постпохмільні депресивні стани [170]. За даними літератури, антиоксиданти

вітамінного походження можуть впливати на вираженість проявів похмільного синдрому [130]. Наразі остаточно не доведено клінічну ефективність застосування АК як мототерапії для усунення проявів похмільного синдрому, але багато авторів зазначають важливе місце вітаміну С в патогенезі розладів, пов'язаних із вживанням алкоголю. Все це обґрунтовує доцільність додати до складу засобу глютамінову кислоту як один із компонентів, необхідних для біосинтезу глутатіону, та аскорбінову кислоту як природний антиоксидант [98, 105].

Одним із найчастіших симптомів похмільного синдрому є головний біль, пов'язаний з прямою пошкоджувальною дією продуктів обміну алкоголю на мембрани клітин головного мозку, активацією простагландинового каскаду та прозапальних інтерлейкінів, енергетичним виснаженням і зневодненням нейроглії тощо [150]. АСК є загальноприйнятим засобом для купірування больового синдрому на тлі алкогольної інтоксикації, ефективність якого було доведено в клінічних дослідженнях лікування епізодів болю як різної етіології, так і болю в разі похмільного синдрому [135].

З одного боку, використання АСК у складі комбінованого засобу для застосування в разі алкогольної інтоксикації можна розглядати як фактор погіршення профілю безпеки засобу, бо токсикодинаміка компонента спрямована на печінку і шлунок, що є найбільш вразливими в пацієнта на тлі вживання алкоголю. З іншого боку, термін реєстрації відомих засобів для усунення симптомів похмільного синдрому з АСК в Україні не продовжено, що призвело до їх зникнення з асортименту, хоча такі засоби присутні на ринках інших країн. Відсутність альтернатив разом із необхідністю зняти больовий синдром може викликати у пацієнтів бажання вжити більш високі дози НПЗЗ [135, 150].

Отже, основними АФІ для оригінальної композиції запропоновано гліцин, ГК, АСК, АК. Дози діючих речовин було дібрано з огляду на наявність відповідних компонентів в аналогах, що присутні або були присутні на фармацевтичному ринку, а також за критерієм віднесення засобу до ОТС-сегмента (табл. Додаток А.1).

3.2 Експериментальні дослідження сумісності компонентів композиції

Наступним етапом розробки стало вивчення сумісності компонентів у комбінованому препараті. Між компонентами можливі різноманітні фізико-хімічні взаємодії, які проявляються на етапах виробництва і зберігання. Можливі зміни сипучості, розчинності, зовнішнього вигляду препарату, накопичення продуктів деградації та взаємодії АФІ. Вивчення сумісності дозволяє оцінити наявність або відсутність суттєвої взаємодії між компонентами ЛЗ, яка могла б знизити ефективність і стабільність готової ЛФ, та вжити коригувальні заходи на етапі фармацевтичної розробки з метою запобігання таким взаємодіям [4, 5, 137, 139].

На підставі рекомендацій ІСН Q8 щодо системного підходу до фармацевтичної розробки ЛЗ для препаратів, що містять більше одного АФІ, маємо оцінити сумісність між складовими компонентами й допоміжними речовинами, зазначеними в п. 3.2.Р.1 модуля 3 реєстраційного дос'є у форматі CTD [82, 83].

Новий комбінований засіб для застосування в разі алкогольної інтоксикації передбачено у формі порошку шипучого для приготування орального розчину. Таку ЛФ запропоновано для прискорення процесу розчинення лікарських речовин за рахунок реакції між натрію гідрокарбонатом і лимонною кислотою. Вуглецю діоксид, що виділяється внаслідок сумісного розчинення, підсилює секреторну, всмоктувальну і моторну функції шлунково-кишкового тракту, підвищуючи біологічну доступність ЛЗ. У процесі вивчення сумісності розглядали як наповнювачі та коригенти смаку ЛЗ такі компоненти, як фруктоза, глюкоза, сахароза та сорбіт [4, 5, 137, 139].

Для оцінювання сумісності було проведено експериментальні дослідження гігроскопічності, хімічної взаємодії / хімічної стабільності та окисно-відновного потенціалу. Результати і висновки щодо гігроскопічності АФІ наведено в табл. 3.1. За результатами досліджень було виявлено, що ГК, АК та натрію гідрокарбонат є негігроскопічними речовинами; гліцин та АСК є слабо гігроскопічними; сорбіт, ЛК безводна є гігроскопічними речовинами, а фруктоза – речовиною, що добре поглинає з повітря воду і розпливається у поглиненій з повітря воді [7]. Існує

вірогідність хімічної взаємодії фруктози з амінокислотами в ході конденсації Майяра, тоді як сорбіт у цю реакцію не вступає [4, 5, 84, 137, 139].

Таблиця 3.1

Визначення гігроскопічності АФІ

АФІ	Середнє значення збільшення маси, %	Висновок
Гліцин	0,5 %	Слабко гігроскопічна
ГК	0,07 %	Негігроскопічна
АСК	1,5 %	Слабко гігроскопічна
АК	0,02 %	Негігроскопічна
Фруктоза	17,9 %	Речовина, що розпливається
Глюкоза	12,5%	Речовина, що розпливається
Сахароза	19,8%	Речовина, що розпливається
Сорбіт	8,3 %	Гігроскопічна
ЛК безводна	5,0 %	Гігроскопічна
Натрію гідрокарбонат	0,04 %	Негігроскопічна

Наступним етапом стало дослідження хімічної сумісності компонентів методом спектрофотометрії. Для цього реєстрували УФ-спектр спочатку окремих субстанцій, а потім попарно в аналогічній концентрації. Абсорбційні спектри поглинання водних розчинів усіх запропонованих компонентів ЛЗ в області довжин хвиль від 220 до 320 нм наведено на рис. 3.1.

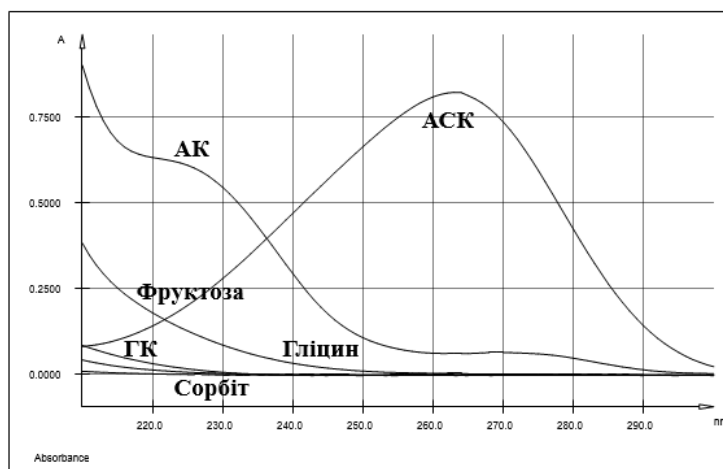


Рис. 3.1 Поглинання водних розчинів компонентів ЛЗ в області довжин хвиль від 210 нм до 320 нм

Дані рис. 3.1 свідчать про відсутність поглинання гліцину, ГК, фруктози та сорбіту в області довжин хвиль від 220 до 320 нм [4, 5, 137, 139].

Для вивчення можливої взаємодії молекул сплановано варіанти двокомпонентних розчинів, що містять у структурі хромофори – АСК та АК з іншими обраними компонентами (рис. 3.2) та з додаванням 0,5 % розчину натрію гідрокарбонату (рис. 3.3, 3.4).

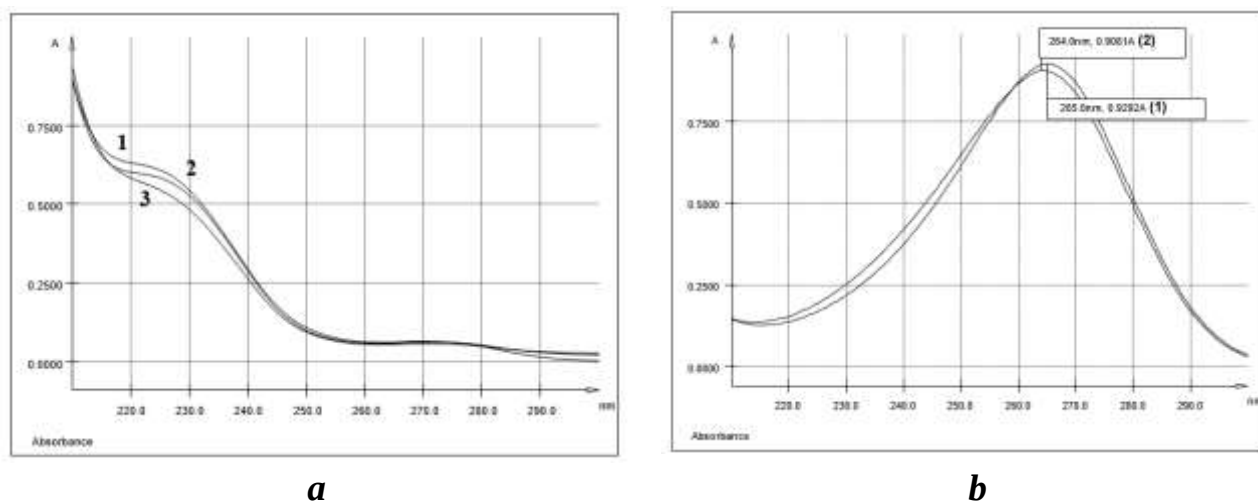


Рис. 3.2 УФ-спектри: **a** – водних розчинів АСК та інших компонентів ЛЗ свіжоприготованого (1), через 12 годин (2), через 24 години (3); **b** – розчину АК та інших компонентів ЛЗ свіжоприготованого (1) та через 12 годин (2)

З'ясовано, що спектри поглинання водних розчинів АСК та АК в разі додавання інших компонентів ЛЗ не зазнають змін. З рис. 3.2 можна зробити висновок щодо відсутності суттєвого впливу компонентів ЛЗ на АК та АСК. АСК у водному розчині поступово розкладається (рис. 3.2 **a**), додавання розчинів інших компонентів ЛЗ дещо збільшує цей процес, але таке збільшення несуттєве [137, 139].

Ризики взаємодії АФІ з натрію гідрокарбонатом оцінювали дослідженням УФ-спектрів, знятих за додавання 0,5 % розчину натрію гідрокарбонату (рис. 3.3 **a-b**).

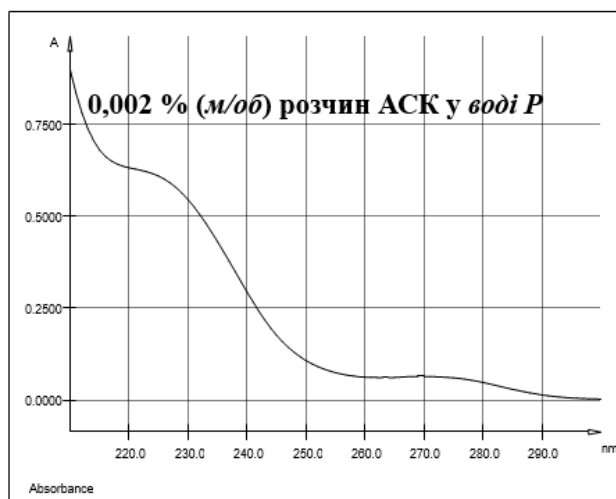
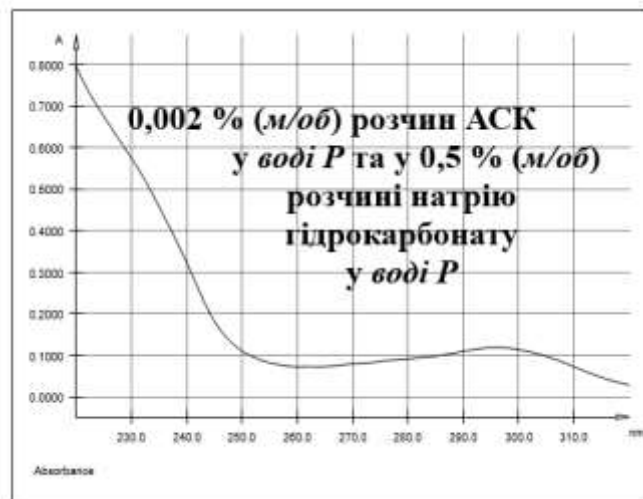
**a****b**

Рис. 3.3 УФ-спектри: **a** – розчину АСК (0,002 %) у воді *P*; **b** – розчину АСК (0,002 %) у воді *P* та у 0,5 % водному розчині натрію гідрокарбонату

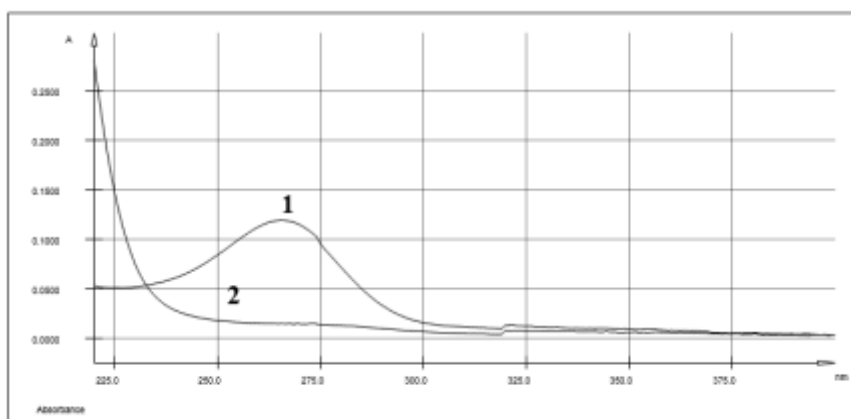


Рис. 3.4 Абсорбційний спектр поглинання розчину аскорбінової кислоти (0,0003 %) у воді (1) та у 0,5 % водному розчині натрію гідрокарбонату (2)

З огляду на хімічні властивості найбільш вірогідним є вплив лужного середовища на АСК та АК (рис. 3.3, 3.4).

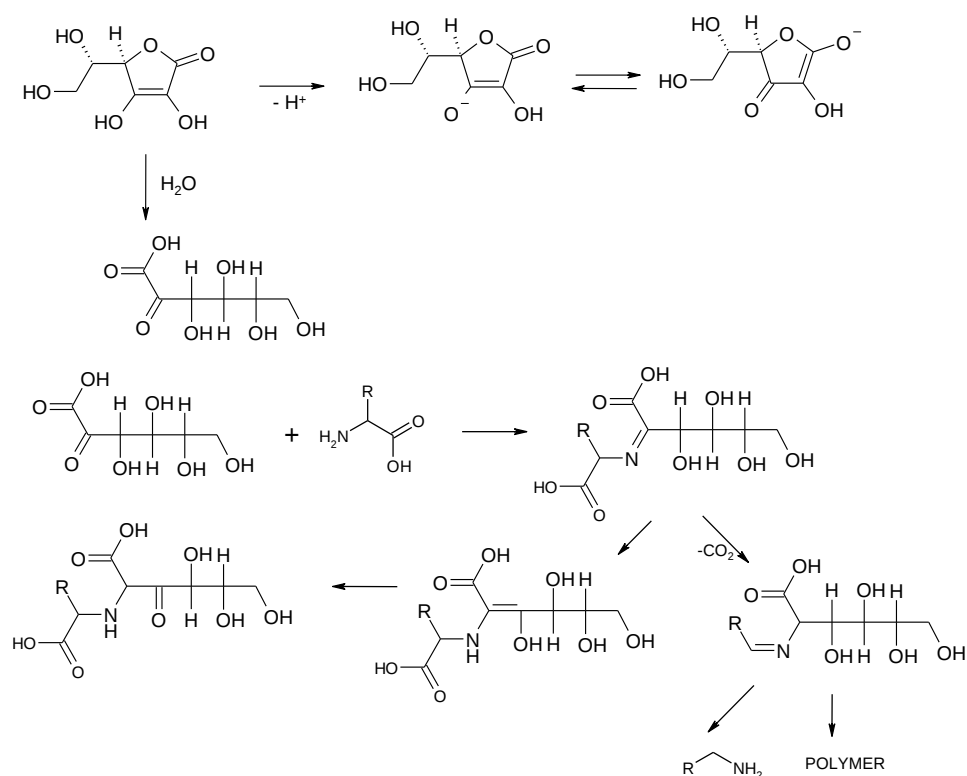
Отже, лужне середовище має негативний вплив на такі компоненти ЛЗ, як АСК та АК. Можливість такого впливу більш суттєво проявляється за наявності у системі води [4, 5, 137, 139].

Наявність у складі оригінальної композиції амінокислот та цукрів зумовлює вірогідність участі цих речовин у цукроамінній конденсації (реакція Майяра, неферментативне глікозилювання). Відомо, що цю реакцію широко

використовують для оцінювання можливих взаємодій компонентів ліків і продуктів харчування [172], а також у дослідженнях стабільності та фармацевтичної розробки [113, 124]. Хімічна реакція між амінокислотою і цукром зазвичай відбувається за нагрівання.

До складу композиції входить аскорбінова кислота, яка за умов реакції Майяра може взаємодіяти з амінокислотами [124] (схема 3.1).

Схема 3.1



Різноманіття реакцій взаємодії аскорбінової кислоти з аліфатичними амінокислотами (схема 3.1) призводить до утворення численних продуктів різної будови, що їх у науковій літературі позначають терміном «кінцеві продукти глікування». До цієї групи належать аліфатичні альдегіди і кетони, гетероциклічні похідні імідазолу, піролу й піразину [5, 137].

Однак аміногрупа амінокислоти вступає в реакцію цукроамінної конденсації тільки тоді, якщо вона незаміщена або кінцева. Глутамінова кислота не проявила здатності до взаємодії з аскорбіновою кислотою [137].

Можливість реакції цукроамінної конденсації для таких компонентів, як аскорбінова кислота та гліцин робить неможливим їх поєднання в одній дозованій

одиниці ЛЗ. Отже, наявність у реакційній суміші карбонільної групи (наприклад, у складі цукрів) і аміногрупи (наприклад, амінокислоти) призводить до послідовного і паралельного перебігу комплексу хімічних процесів, що спричинює візуальну зміну кольору суміші сполук. Ця реакція прискорюється підвищенням температури [5, 137, 139].

Для визначення можливих окислювально-відновних реакцій серед компонентів ЛЗ аналізували властивості АФІ, зважаючи на будову їх молекул та відомі характеристики, описані в науковій літературі.

Аскорбінова кислота – відновлювальна сполука, використовувана у фармації як антиоксидант, в організмі бере участь в окислювально-відновних реакціях (окисно-відновний потенціал $-0,19$ в). Здатність гліцину до окисно-відновних реакцій вірогідна (окисно-відновний потенціал $-0,05$ в). Тому можливість окиснення цих речовин киснем повітря видається ймовірним і критичним фактором. Відповідно до наведених окисно-відновних потенціалів φ_0 найбільш лабільна речовина для процесів окислення у ЛФ є аскорбінова кислота, що виконуватиме роль антиоксиданту для такого компонента, як гліцин [4, 5, 137, 139].

Поєднання компонентів не призведе до окислювально-відновних реакцій. Але з огляду на те, що відновний компонент ЛЗ може бути окислений киснем повітря і що медіатором цього процесу може бути лужне середовище (для аскорбінової кислоти), бажано відділити лужну компоненту відповідного АФІ. За неможливості такого відділення треба максимально знизити вірогідність впливу вологи на суміш [4, 5, 137].

Присутність натрію гідрокарбонату може каталізувати процес окиснення АК киснем повітря, тому їх сумісна присутність також є небажаною.

За результатами досліджень було вирішено розділити АФІ на 2 пакети, відокремивши натрію гідрокарбонат та гліцин, що можуть взаємодіяти з АК/АСК та АК та в обидви пакети додати в якості коригенту смаку сорбіт [4, 5, 137, 139].

3.3 Оптимізація технології комбінованого фармакологічного засобу у формі порошку шипучого для орального розчину

Основним завданням фармацевтичної розробки було створити й обґрунтувати технології виготовлення оригінального ЛЗ у формі порошку, який під час розчинення виявляє шипучий ефект, із такими діючими речовинами: гліцин, кислота глутамінова, ацетилсаліцилова кислота та аскорбінова кислота [137].

Через те що ЛЗ із вищезазначеними діючими речовинами у формі порошку для орального розчину на фармацевтичному ринку не існує, то, розробляючи склад, керувалися теоретичними даними та рекомендаціями фармакологів щодо дозування компонентів [137].

Розробка складу ЛЗ передбачала розгляд можливості застосування різних видів допоміжних речовин та їх модифікацій у комплексі з різними типовими схемами технологічного процесу одержання шипучих порошоків, які відповідали б вимогам ДФУ [137].

На первинному етапі фармацевтичної розробки попередньо нами було визначено сумісність діючих та допоміжних речовин. За результатами досліджень вирішено розділити дозування препарату на 2 пакети, що вміщують визначені комбінації сумішей діючих та допоміжних речовин (розділ 3.2) [137, 142]. На підставі аналізу компонентного складу препарату й аналогічних препаратів, описаних в літературі, результатів визначення фізико-хімічних і технологічних властивостей субстанцій було виготовлено експериментальні зразки препарату складів № 1 – № 4 масою по 4,00 г (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Склад і співвідношення інгредієнтів в експериментальних зразках №1 – №4

Найменування компонентів	Вміст інгредієнта							
	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)
Склад і співвідношення інгредієнтів на один пакет № 1								
	склад № 1		склад № 2		склад № 3		склад № 4	
Глутамінова кислота	500,00	12,25	500,00	12,25	500,00	12,25	500,00	12,25

Продовження таблиці 3.2

Найменування компонентів	Вміст інгредієнта							
	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)
Ацетилсаліцилова кислота	325,00	8,125	325,00	8,125	325,00	8,125	325,00	8,125
Аскорбінова кислота	100,00	2,50	100,00	2,50	100,00	2,50	100,00	2,50
Фруктоза	2150,00	53,75	—	—	—	—	—	—
Глюкоза	—	—	2150,00	53,75	—	—	—	—
Сахароза	—	—	—	—	2150,00	53,75	—	—
Сорбіт	—	—	—	—	—	—	2150,00	53,75
Лимонна кислота моногідрат	925,00	23,125	925,00	23,125	925,00	23,125	925,00	23,125
Разом	4000,00	100,00	4000,00	100,00	4000,00	100,00	4000,00	100,00
Склад і співвідношення інгредієнтів на один пакет № 2								
Гліцин	300,00	7,50	300,00	7,50	300,00	7,50	300,00	7,50
Натрію гідрокарбонат	1600,00	40,00	1600,00	40,00	1600,00	40,00	1600,00	40,00
Фруктоза	2100,00	52,50	—	—	—	—	—	—
Глюкоза	—	—	2100,00	52,50	—	—	—	—
Сахароза	—	—	—	—	2100,00	52,50	—	—
Сорбіт	—	—	—	—	—	—	2100,00	52,50
Разом	4000,00	100,00	4000,00	100,00	4000,00	100,00	4000,00	100,00

Враховуючи фізико-хімічні властивості діючих і допоміжних компонентів ЛФ, вивчені у попередніх дослідженнях (розділ 3.3), зокрема значний ступінь гігроскопічності речовин (фруктоза, сорбіт, лимонна кислота) та здатність вступати у хімічні реакції в присутності надлишкової кількості води (лимонна кислота) [142], як матеріал для первинного пакування одержаних порошків було обрано буфлен. Він становить собою стрічку з алюмінієвої фольги та комбінованих полімерних матеріалів, які забезпечують надійний захист від адсорбування води повітря, має хімічну стійкість і біологічну інертність до лікарського препарату, забезпечує стабільність лікарської форми до навколишнього середовища та дозволяє збільшити термін придатності засобу під час зберігання [2, 4, 5, 137, 139].

Одержані суміші було розфасовано в пакети з буфлену, герметично упаковано та поміщено в стресові умови за температури 60 °C впродовж 1 доби. Після витримання пакетів експериментальних зразків складу № 1 – № 4 у стресових умовах візуально оцінювали зовнішній вигляд вмісту пакетів (табл. 3.7) [137]. Зважаючи на визначену ЛФ та масу вмісту порошку в одному пакеті (4,0 г),

можемо констатувати найбільш помітний вплив обраних допоміжних речовин на якісні та технологічні характеристики запропонованого препарату. Склад зразків № 1 – № 4 відрізнявся вмістом наповнювачів (фруктоза, глюкоза, сахароза, сорбіт), масова частка яких в одному пакеті складає від 52,5 % до 53,75 %. За результатами, наведеними в табл. 3.3, було визначено непридатність використання фруктози, глюкози та сахарози для застосування у подальших дослідженнях, тоді як склад № 4 відповідав заявленим вимогам [137, 139].

Таблиця 3.3

Оцінювання зовнішнього вигляду експериментальних зразків після впливу стресових умов

Назва експериментального зразка	Наповнювач	Вплив стресових умов на зовнішній вид зразка
Склад № 1	Фруктоза	Суміші пакетів змінили білий колір на коричневий. Суміш у пакетах розпливається.
Склад № 2	Глюкоза	Суміші пакетів змінили білий колір на коричневий.
Склад № 3	Сахароза	Суміші пакетів змінили білий колір на коричневий.
Склад № 4	Сорбіт	Суміші пакетів не змінили колір. Колір білий.

Розробляючи препарат для виготовлення орального розчину, також звертали особливу увагу на досягнення прийнятних смакових властивостей, що є важливим фактором споживчої придатності препарату. Для органолептичного оцінювання сьогодні найчастіше використовують відповідні методи, зокрема визначення числового індексу смаку, що свідчить про найкращу маскувальну силу середовища [2, 4, 5, 139].

Варто зауважити, що всі експериментальні зразки (№ 1 – № 4) препарату складаються зі значної кількості речовин, які мають власні смакові характеристики і можуть впливати на загальний смак готового продукту (АК, ГК, АК, гліцин). Проте найбільш вагомими речовинами, які зумовлюють основні смакові якості препарату, постають солодкі речовини – фруктоза, глюкоза, сахароза та сорбіт, а

шипучий ефект досягається в першу чергу завдяки реакції взаємодії між речовинам – ЛК та натрію гідрокарбонату [5, 137, 139].

Для зразків випробовуваних розчинів з різним вмістом основних коригентів визначали числові індекси, які характеризують комплексну оцінку смаку як з погляду його інтенсивності, так і сприятливих емоційних відчуттів. Результати цих досліджень наведено в табл. 3.4 [137].

Таблиця 3.4

Вплив основних коригентів на зміну смакових відчуттів досліджуваного препарату (за методикою А. І. Тенцової)

Номер складу препарату	Найменування та вміст коригентів, г			Значення числового індексу
	Наповнювач	Натрію гідрокарбонат	Кислота лимонна моногідрат	Середній бал об'єктивних відчуттів
Склад № 1	Фруктоза – 4,25	1,6	0,925	1,2
Склад № 2	Глюкоза – 4,25	1,6	0,925	1,7
Склад № 3	Сахароза – 4,25	1,6	0,925	2,0
Склад № 4	Сорбіт – 4,25	1,6	0,925	2,5

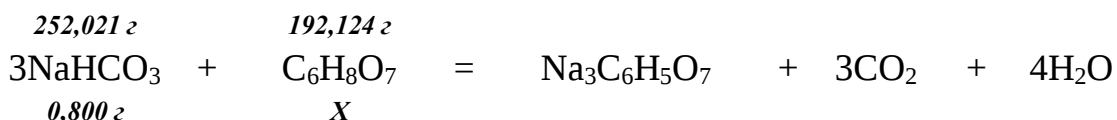
За результатами оцінювання всі розчини експериментальних зразків № 1 – № 4 мають низькі значення числового індексу та викликають неприємні відчуття смаку. Всі зразки мають солодко-кислий основний смак з переважним гірко-соленим (лужним) присмаком натрію гідрокарбонату. Визначаючи основний солодко-кислий відтінок смаку, з'ясували, що використані наповнювачі (за однакової кількості в розчині) виявляють різну інтенсивність солодкості. За шкалою одиниць відносної солодкості використані нами коригенти відповідно до зменшення інтенсивності солодкості можна розташувати так: фруктоза (1,75), сахароза (1,0), глюкоза (0,75), сорбіт (0,5) [137]. Враховуючи, що лікарський засіб має використовуватися в разі алкогольної інтоксикації, всі дослідники віддали перевагу коригенту з найменшим показником одиниці солодкості (сорбіт). Перевагою сорбіту є і те, що він, як і фруктоза, не вимагає гормону інсуліну для

засвоєння в організмі і його можна використовувати пацієнтам, хворим на цукровий діабет [2, 4, 5, 137, 139].

На підставі отриманих результатів було визначено, що серед випробовуваних експериментальних зразків найбільш прийнятним є смак розчину зі складом № 4. Але наявний присмак питної соди не задовольняв належні смакові властивості препарату і навіть викликав блювотний рефлекс у деяких випробувачів. Це було зумовлено наявністю надлишку натрію гідрокарбонату, що не прореагував у ході реакції з ЛК [137].

З метою зниження впливу цих речовин на загальний смак продукту нами було вирішено зменшити кількість натрію гідрокарбонату вдвічі до 800 мг. Такий вміст натрію гідрокарбонату у випробовуваному розчині (200 мл) складає 4 г/л, що відповідає середньому вмісту гідрокарбонатів (3,4– 6,5 г/л) у майже всіх природних мінеральних водах – одному з найпоширеніших споживчих товарів [137, 139].

З метою забезпечення стабільності препарату впродовж тривалого терміну зберігання нами запропоновано використовувати у його складі ЛК безводну. Було розраховано кількість ЛК, а саме 0,610 г, що забезпечує проходження повної реакції нейтралізації з натрію гідрокарбонатом та створення шипучого ефекту під час розчинення порошків [2, 4, 5]:



Однак, враховуючи значну гігроскопічність ЛК і її можливість поглинати вологу під час зберігання, нами було також запропоновано збільшити масу ЛК (до 0,700 г) для того, щоб у разі поглинання молекули води її кількість була достатньою для нейтралізації субстанції натрію гідрокарбонату [2, 4, 5, 139].

Для наступних досліджень було сформовано додаткові зразки експериментальних сумішей складів № 5 та № 6 з відкоригованим вмістом натрію гідрокарбонату і ЛК та порівняно ці зразки зі зразком № 4 за методом А. І. Тенцової з метою визначення органолептичної оцінки (табл. 3.5, табл. 3.6) [137].

Таблиця 3.5

Склад і співвідношення інгредієнтів в експериментальних зразках № 5 та № 6

Найменування компонентів	Вміст інгредієнта			
	мг	% (м/м)	мг	% (м/м)
Склад і співвідношення інгредієнтів на один пакет № 1				
	Склад № 5		Склад № 6	
Глутамінова кислота	500,00	12,50	500,00	12,50
Ацетилсаліцилова кислота	325,00	8,125	325,00	8,125
Аскорбінова кислота	100,00	2,50	100,00	2,50
Лимонна кислота безводна	610,00	15,25	700,00	17,50
Сорбіт	2465,00	61,625	2375,00	59,375
Разом	4000,00	100,00	4000,00	100,00
Склад і співвідношення інгредієнтів на один пакет № 2				
Гліцин	300,00	7,50	300,00	7,50
Натрію гідрокарбонат	800,00	20,00	800,00	20,00
Сорбіт	2900,00	72,50	2900,00	72,50
Разом	4000,00	100,00	4000,00	100,00

Таблиця 3.6

Результати оцінювання впливу кількості коригентів на зміну смакових відчуттів для фармакотерапії алкогольної інтоксикації (за методикою А. І. Тенцової)

Номер складу	Найменування та вміст коригентів, г			Середній бал об'єктивних відчуттів
	Наповнювач сорбіт	Натрію гідрокарбонат	Кислота лимонна	
Склад № 5	5,365	0,800	Безводна – 0,610	3,7
Склад № 6	5,275	0,800	Безводна – 0,700	4,5

Отримані результати дозволяють констатувати, що найбільший індекс смакового відчуття отримав склад № 6. Проти інших зразків він має більш кислуватий присмак [137].

Задля порівняння органолептичних властивостей розроблюваного продукту зі складом № 6 додатково було оцінено препарати, присутні на фармацевтичному

ринку для лікування алкогольної інтоксикації: Медихронал®-Дарниця (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), Алка-Зельцер (Bayer Bitterfeld GmbH, Німеччина), Глутаргін Алкоклін (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»), Алька-Прим® (Фармацевтичний завод "Polpharma" S.A., Польща). На думку всіх дослідників, які брали участь у випробуваннях, розчин препарату складу № 6 не поступається за смаковими характеристиками іншим препаратам, що наразі виробляє фармацевтична промисловість [5, 137].

Результати дослідження технологічних властивостей (насипна маса, насипний об'єм, текучість) експериментальних сумішей пакета № 1 та пакета № 2 обраного складу № 6 наведено в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Фармакотехнологічні характеристики досліджуваних експериментальних сумішей препарату для лікування алкогольної інтоксикації (пакет 1 та пакет 2)

Найменування характеристик	Пакет 1	Пакет 2
Плинність, с/100 г	$3,96 \pm 0,02$	$2,91 \pm 0,02$
Насипний об'єм V_0 , мл	$172,0 \pm 0,2$	$135,0 \pm 0,2$
Об'єм після усадки V_{10} , мл	$169,0 \pm 0,1$	$133,0 \pm 0,2$
Об'єм після усадки V_{500} , мл	$153,0 \pm 0,1$	$130,0 \pm 0,1$
Об'єм після усадки V_{1250} , мл	$152,0 \pm 0,2$	$130,0 \pm 0,2$
Здатність до усадки $V_{10} - V_{500}$, мл	$16,0 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,5$
Насипна густина m/V_0 , г/мл	$0,5816 \pm 0,02$	$0,7419 \pm 0,01$
Густина після усадки m/V_{1250} , г/мл	$0,6581 \pm 0,02$	$0,7704 \pm 0,01$

Примітка. $n = 5$; $P = 95 \%$

Виходячи з мікроскопічного аналізу активних фармацевтичних інгредієнтів і допоміжних компонентів суміші, встановлено, що розмір часток компонентів порошків не перевищує 160 мкм [9], що забезпечує однорідності дозування і фасування, а також для уникнення проблем з ущільненням або грудками порошку.

Використання методу безпосереднього змішування забезпечує прийнятні технологічні показники якості як пакета № 1, так і пакета № 2, та забезпечує однорідність фасування лікарського засобу [137].

Отже, за фармакотехнологічними та споживчими властивостями склад № 6 визначено як оптимальний для подальшого розроблення препарату для фармакотерапії алкогольної інтоксикації, що його було напрацьовано в кількості 3-х серій у пакетах з буфлену для вивчення стабільності та терміну придатності.

Вибір і оптимізацію виробничого процесу виконували паралельно з розробленням складу ЛФ. Було визначено основні аспекти вибору технології виробництва. Для усунення ризику порушення однорідності вмісту діючих речовин і отримання порошку із заданими показниками якості, з використанням заявлених субстанції, було обрано метод безпосереднього змішування порошків, що дозволяє зменшити економічні, технологічні, ресурсні та працевзатрати з виготовлення препарату.

Підготовка виробництва включає такі операції, як підготовка вентиляційного повітря, приготування дезрозчинів, підготовка приміщень та обладнання, підготовка технологічного одягу, підготовка персоналу.

Стадія 1. Підготовка сировини. Уся сировина та матеріали проходять вхідний контроль якості субстанції, вихідної сировини, допоміжних матеріалів та матеріалів первинного пакування. Вхідний контроль якості проводиться у Відділі контролю якості (ВКЯ).

На терезах відважують глютамінову кислоту, ацетилсаліцилову кислоту, аскорбінову кислоту, лимонну кислоту безводну, гліцин, натрію гідрокарбонат, сорбіт. Для видалення забруднень або сторонніх включень, що випадково потрапили в сировину, її просіюють на вібраційному ситі. Відважену сировину поміщають в збірники і передають для просіювання на віброситі. На збірники наклеюють етикетку з вказівкою найменування сировини, серії, дати, прізвища і підпису апаратника.

Просіяну сировину вміщують у збірники. Глутамінову кислоту, ацетилсаліцилову кислоту, аскорбінову кислоту, лимонну кислоту безводну, сорбіт передають на стадію 2 «Отримання порошку 1». Гліцин, натрію гідрокарбонат, сорбіт передають на стадію 3 «Отримання порошку 2».

Стадія 2. Отримання порошку 1. Відважену та просіяну сировину (глутамінова кислота, ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота, лимонна кислота безводна, сорбіт) зі стадії 1 вміщують у кубічний змішувач та протягом 20 хвилин проводять перемішування при швидкості перемішування 20 об/хв. Отриману однорідну суміш вміщують в збірник та передають на стадію 4 «Фасування порошоків в саше-пакети».

Стадія 3. Отримання порошку 2. Відважену та просіяну сировину (гліцин, натрію гідрокарбонат, сорбіт) зі стадії 1 вміщують у кубічний змішувач та протягом 20 хвилин проводять перемішування при швидкості перемішування 20 об/хв. Отриману однорідну суміш вміщують в збірник та передають на стадію 4 «Фасування порошоків в саше-пакети».

Стадія 4. Фасування порошоків в саше-пакети. Суміші отриманих порошоків вміщують у відповідні бункери автомата наповнення та запаювання саше-пакетів. Регулюють масу наповнення саше-пакетів за об'ємом, контролюють температуру пристроїв формування і термосклеювання саше-пакетів. Запаєні саше-пакети із порошком 1 та порошком 2 контролюють за визначеними показниками проміжного контролю.

Стадія 5. Пакування саше-пакетів у пачку. Саше-пакети із порошками пакують у пачку, разом із інструкцією до застосування. Контролюють маркування пачки, кількість саше-пакетів в пачці, комплектність. Процес пакування проводять на автоматичній лінії пакування.

Стадія 6. Пакування в групову тару. Саше-пакети в пачці пакують в короба. На коробах розміщують групову етикетку. Контролюють маркування коробів, кількість пачок саше-пакетів, комплектність. Процес пакування проводять на автоматичній лінії пакування.

Технологічна схема виготовлення комбінованого фармакологічного засобу наведена на рис. 3.5.

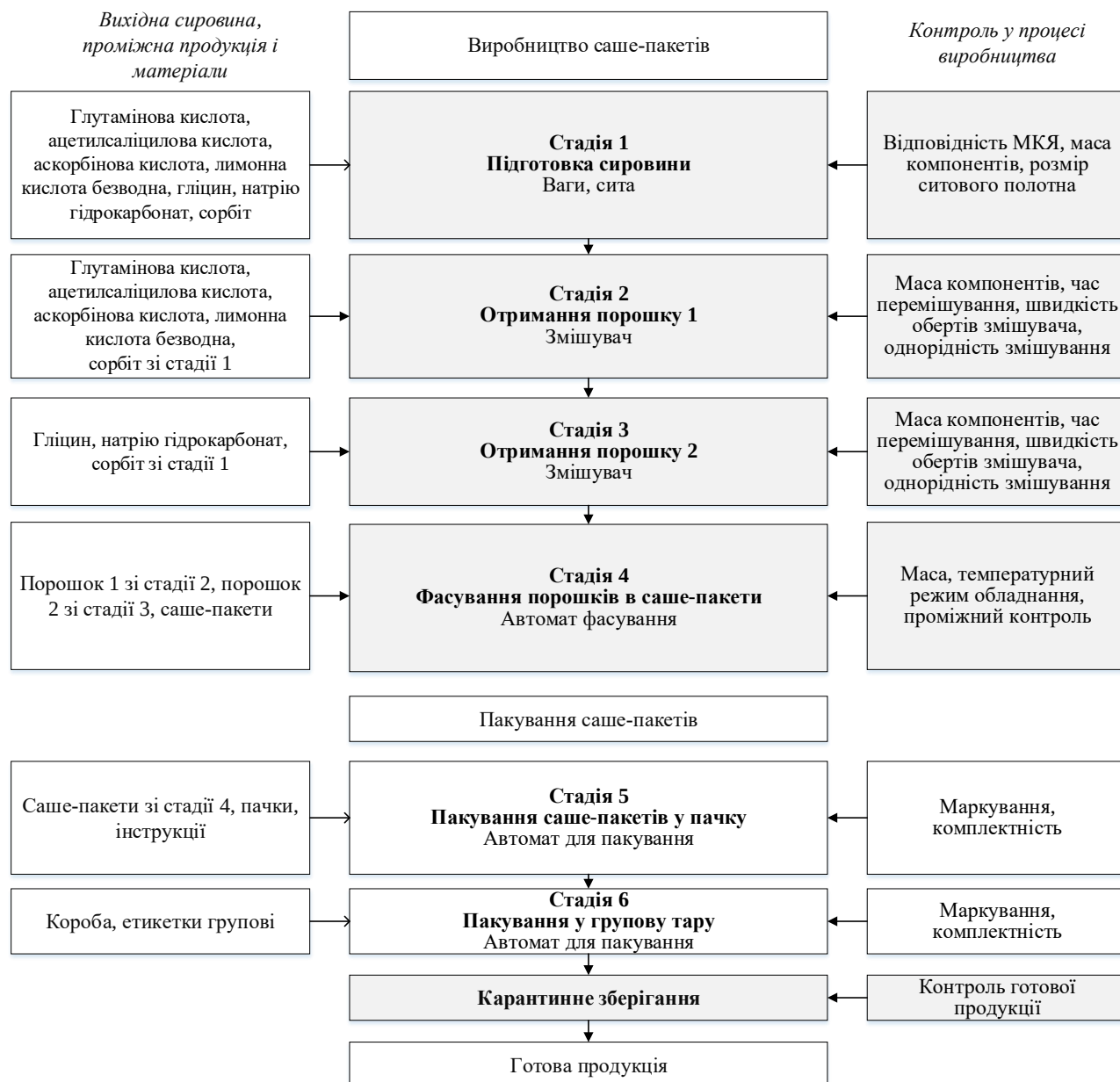


Рис. 3.5 Технологічна схема виробництва комбінованого фармакологічного засобу у саше-пакетах

Критичні параметри процесу технологічного процесу виробництва наведено в табл. 3.8.

Експериментально з'ясовано, що параметри технологічного процесу є базовими для напрацювання дослідно-промислових серій препарату в умовах підприємства і розробки схеми валідації технологічного процесу.

Таблиця 3.8

Критичні параметри процесу виробництва

Критичні етапи технологічної операції	Параметри	Критерії прийнятності	Метод контролю
Стадія 1. Підготовка сировини			
Підготовка і зважування сировини	Кількість компонентів	У відповідності до виробничої рецептури	Ваговий
Стадія 2. Отримання порошку № 1			
Змішування компонентів	Режим процесу змішування	Швидкість обертів змішувача – 20 об/хв Час перемішування – 20 хв	Програмне керування
Маса суміші № 1	Кількісний вихід проміжної продукції	Відповідно до технологічної інструкції	Ваговий Кількісний
Стадія 3. Отримання порошку № 2			
Змішування компонентів	Режим процесу змішування	Швидкість обертів змішувача – 20 об/хв Час перемішування – 20 хв	Програмне керування
Маса суміші № 2	Кількісний вихід проміжної продукції	Відповідно до технологічної інструкції	Ваговий
Контроль всіх показників проміжної продукції відповідно до специфікації			
Стадія 4. Фасування порошоків у саше-пакети			
Формування пакету	Режим формування пакету	- температура пристроїв формування і термосклеювання; - режим подачі вхідного повітря	Програмне керування
Фасування	Рівень заповнення бункера	Дотримання рівня заповнення бункера	Візуально
У пакети № 1 та пакети № 2	Заповнення пакету	Незаповнені пакети відбраковуються	Контрольний датчик
	Герметичність пакетів	Пакети повинні бути герметичні	СОП по перевірці пакетів
	Зовнішній вид пакету	У відповідності до інструкції з пакування	Візуально маркування

3.4 Дослідження гепатопротекторного ефекту нового фармакологічного засобу на моделі алкогольного ураження печінки в щурів

В умовах проведених експериментів моделювання алкогольного гепатиту супроводжувалось ураженням гепатоцитів, що підтверджувалось вірогідним щодо інтактних тварин зростанням активності АлАТ у сироватці крові на 57,4 % (табл. 3.9). Зазначене демонструє розвиток на тлі модельної патології цитолітичного синдрому, викликаного пошкодженням мембран гепатоцитів. Разом із тим про зниження функціональної активності печінки свідчить достовірне зменшення рівня загального білка в сироватці крові на 22,4 %, якщо порівнювати зі здоровими тваринами (табл. 3.2). Зазначені зміни віддзеркалюють пригнічення білоксинтезувальної функції гепатоцитів, що узгоджується із загальновідомими даними щодо впливу тривалого вживання етанолу [86, 113, 142].

Таблиця 3.9

Маркерні показники функціонального стану печінки в сироватці крові щурів на тлі застосування досліджуваних засобів, $M \pm m$ (n = 7)

Дослідна група	Загальний білок, г/л	АлАТ, мккат/л
ІК	71,45±4,28	0,68±0,09
КП	55,50±3,75 ¹	1,07±0,14 ¹
ТЗ-ПП	63,19±3,50	0,71±0,08 ²
РЗ-ГА	68,22±3,86 ²	0,56±0,06 ²
РЗ-МД	60,82±3,51	0,79±0,06 ³

Примітки:

1. – відмінності, вірогідні щодо тварин групи інтактного контролю ($p < 0,05$);
2. – відмінності, вірогідні щодо тварин групи контрольної патології ($p < 0,05$);
3. – відмінності, вірогідні щодо тварин референтної групи РЗ-ГА (Глутаргін Алкоклін) ($p < 0,05$);
4. – відмінності, вірогідні щодо тварин референтної групи РЗ-МД (Медихронал®-Дарниця) ($p < 0,05$).

Таблиця 3.10

Маркери ПОЛ/АОС в гомогенаті печінки щурів на тлі застосування досліджуваних засобів, $M \pm m$ (n = 7)

Дослідна група	ВГ, у. о.	ТБК-АП, мкмоль/г
ІК	32,51±2,02	38,46±3,15
КП	25,16±1,69 ¹	49,27±3,21 ¹
ТЗ-ПП	34,23±1,47 ²	36,26±2,51 ²
РЗ-ГА	31,73±2,20 ²	35,71±1,89 ²
РЗ-МД	30,94±1,95 ²	39,38±2,53 ²

Примітки:

1. – відмінності, вірогідні щодо тварин групи інтактного контролю ($p < 0,05$);
2. – відмінності, вірогідні щодо тварин, групи контрольної патології ($p < 0,05$).

Застосування в подальшому лікувально-профілактичному режимі ТЗ-ПП супроводжувалось нормалізацією вмісту загального білка та активності АлАТ в сироватці крові тварин: показники достовірно не відрізнялись від аналогічних показників у групі ІК ($p > 0,05$). Важливо, що активність АлАТ у тварин цієї групи достовірно зменшувалась на 33,6 % ($p < 0,05$) щодо групи КП, що свідчить про зменшення процесів руйнування мембран гепатоцитів під дією етанолу (табл. 3.10). Антицитолітичний вплив досліджуваного засобу ймовірно пов'язаний із мультифакторними гепатопротекторними й антиоксидантними властивостями амінокислот, що містяться у його складі. Крім того, аскорбінова кислота, що входить до складу, може залучатись для підтримки функціонування системи монооксигеназного окиснення, яка є ключовою у знешкодженні етанолу, у такий спосіб запобігаючи його ушкоджувальному впливу на клітини печінки [66, 99]. Не виключено також, що препарат може позитивно впливати на енергозабезпечення клітин, зокрема гепатоцитів, за рахунок вмісту глютамінової кислоти, яка залучається до процесів переамінування [142].

Застосування препарату порівняння Глутаргін Алкоклін® супроводжувалось достовірною нормалізацією активності АлАТ та рівня загального білка в сироватці крові ($p > 0,05$ проти КП), а проте показники також достовірно не відрізнялись від

здорових тварин ($p > 0,05$ проти ІК). Зазначену динаміку змін, вірогідно, зумовлено комплексним впливом препарату, пов'язаним із мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями засобу, а також активаційним впливом на ферментні системи, залучені до утилізації етанолу та його токсичних метаболітів [142, 151].

В умовах нашого дослідження найменш виразний ефект спостерігали за застосування препарату Медихронал®-Дарниця: попри те, що вміст загального білка в сироватці крові тварин на тлі його застосування значуще не відрізнявся від показника інтактних щурів ($p > 0,05$), активність АЛАТ за умов лікувально-профілактичного введення вірогідно не відрізнялась від тварин групи КП ($p > 0,05$ проти КП), але поступалась ефективності в групі РЗ-ГА ($p < 0,05$) (табл. 3.10). Передбачено, що отримані дані пов'язані з тим, що гепатопротекторна дія препарату Медихронал®-Дарниця реалізується через кон'югацію основного токсичного метаболіту алкоголю – ацетальдегіду (реакція із натрію форміатом) [59, 142].

Однією із ключових ланок патогенезу токсичного впливу етанолу є активація вільнорадикального окиснення та виснаження систем антиоксидантного захисту, наслідком чого є інтенсифікація перикисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що підтверджено в умовах наших експериментів вірогідним зростанням вмісту ТБК-АП у гомогенаті печінки за одночасного достовірного зниження рівня ВГ – на 28,1 % та 22,7 % відповідно щодо групи ІК ($p < 0,05$, табл. 3.11) [49, 50, 142].

Важливо зауважити, що застосування всіх досліджуваних засобів супроводжувалось нормалізацією антиоксидантно-прооксидантного статусу печінки, про що свідчило вірогідне зниження рівня ТБК-АП та підвищення показника ВГ у гомогенаті печінки щодо групи КП ($p < 0,05$) (табл. 3.11). Ми передбачаємо, що реалізація антиоксидантних властивостей досліджуваного засобу ТЗ-ПП пов'язана саме із відновленням синтезу ВГ, бо він містить глутамінову кислоту та гліцин – два із трьох необхідних компонентів для біосинтезу глутатіону [81]. Крім того, досліджуваний тест-зразок містить аскорбінову кислоту, яка також проявляє антиоксидантні властивості. Референс-препарати Глутаргін Алкоклін® та Медихронал®-Дарниця реалізували свою

антиоксидантну дію, ймовірно, також через відновлення синтезу ВГ, адже вони містять відповідні амінокислоти [142].

3.5 Дослідження впливу тест-зразка на поведінкові реакції після одноразового введення етанолу

Після одноразової етанолової інтоксикації у всіх тварин спостерігали пригнічення активності ЦНС, що відображалось у зменшенні суми поведінкових реакцій у тесті «відкрите поле», переважно локомоторних та орієнтовно-дослідницьких (табл. 3.11) [142].

Застосування досліджуваних засобів певною мірою давало змогу нормалізувати стан ЦНС у експериментальних тварин. Проте варто зазначити, що найменший вплив засоби продемонстрували на показник вертикальних стійок, що може бути пов'язано з пригніченням роботи вестибулярного апарату після наркозу. Крім того, в усіх групах, де тваринам вводили засоби, кількість уринацій перебувала на рівні негативного контролю (НК) та відрізнялася від інтактного показника вірогідно або на рівні тенденції. Варто зауважити, що це насамперед пов'язано з діуретичним ефектом алкоголю, а не з особливостями впливу засобів на психоемоційний стан тварин. А відсутність зменшення кількості уринацій у цьому випадку треба розглядати як позитивний фактор, що сприяє загальній неспецифічній детоксикації організму тварин. Також в обох референтних групах спостерігали вірогідне збільшення кількості дефекацій проти ТЗ-ПП, що може свідчити про вплив цих засобів на перистальтику кишечника, хоча цей ефект не зберігався в наступній серії тесту (табл. 3.11) [142].

Так, досліджуваний тест-зразок продемонстрував найбільш значущий ефект серед усіх використаних засобів для усунення алкогольної інтоксикації: відновлював майже всі локомоторні та вегетативні показники та їх суму, що статистично не відрізнялася від інтактного контролю ($p > 0,05$). Із цим кількість зазирань в отвори підлоги установки «відкрите поле» вірогідно перевищувало аналогічні показники в

обох групах НК та РЗ-ГА ($p < 0,05$), що свідчить про покращення роботи відділів ЦНС, що відповідають за дослідницьку та пошукову активність (табл. 3.11) [142].

Дещо поступався тест-зразку в цьому тесті референтний засіб Медихронал®-Дарниця, на тлі застосування якого сума всіх реєстрованих реакцій статистично не відрізнялася від інтактного контролю ($p > 0,05$), хоча й була трохи меншою (табл. 3.11) [142].

Засіб Глутаргін Алкоклін сприяв відновленню лише деяких видів реакцій, сума яких не досягала рівня ІК та була вірогідно менша ($p < 0,05$). Проте необхідно зазначити, що група РЗ-ГА була єдина, де кількість уринацій перевищувала аналогічний показник у групі ІК статистично значуще ($p < 0,05$), що найпевніше пов'язано зі здібностями аргініну прискорювати орнітиновий цикл та поліпшувати екскрецію сечовини із сечею (табл. 3.11) [142].

Через добу після етанолового сну спостерігали значне зменшення наслідків інтоксикації в піддослідних тварин, проте за сумою всіх показників (здебільшого через локомоторні та орієнтовно-дослідницькі) реєстрували відкладені наслідки надмірного вживання алкоголю ($p < 0,05$ проти ІК). У цій серії експерименту всі досліджувані засоби продемонстрували наявність позитивного ефекту, який, з одного боку, може бути наслідком певного часу від моменту інтоксикації та опосередковуватися власними детоксикаційними ресурсами організму, а з іншого – все ж таки більш ймовірно, що через добу повною мірою проявляються довгострокові ефекти амінокислот (детоксикаційні, антиоксидантні). Крім того, як і в попередньому тесті, спостерігали тенденцію до збільшення кількості уринацій саме у тварин, які отримували препарати, що також може свідчити про прискорення метаболізму та екскреції токсикантів під дією цих засобів (табл. 3.11) [142].

За сумою всіх видів активності через добу в тесті «відкрите поле» найбільшу ефективність до нормалізації стану тварин продемонстрував тест-зразок, зазначений показник в групі тварин, що його отримували, практично не відрізнявся від інтактного контролю ($p > 0,05$) та статистично перевищував аналогічний показник у групі негативного контролю ($p < 0,05$). Такий ефект насамперед був опосередкований вірогідним відновленням показника локомоторної активності до рівня умовно здорових

тварин ($p < 0,05$ проти НК). Такий ефект, ймовірно, був спричинений наявністю в експериментальному зразку ацетилсаліцилової кислоти, що могла ефективно вгамовувати м'язовий і головний біль у тварин як одразу після інтоксикації, так і через добу – впродовж усього умовного періоду похмільного синдрому (табл. 3.11) [142].

З огляду на час, що минув після інтоксикації, на момент другої серії тесту «відкрите поле» всі досліджувані препарати проявляли ефект майже на одному рівні. Активність обох референтних засобів займала середню позицію між інтактним та негативним контролем і вірогідно не відрізнялася від обох ($p > 0,05$), з тенденцією збільшення в бік інтактних показників. У результаті детального аналізу всіх досліджуваних показників у тварин груп РЗ-ГА й РЗ-МД значних особливостей виявлено не було (табл. 3.11) [142].

Всі складові компоненти комбінованого засобу є відомими ЛЗ. Поєднання їх в одній фармацевтичній композиції є новим і не відомим з джерел інформації. Фармакологічні дослідження свідчать про те, що застосування кожного з описаних компонентів окремо навіть ударними дозами, не призводить до усунення алкогольної інтоксикації по всіх симптомах. Сукупність складових інгредієнтів за рахунок їх взаємного впливу забезпечує синергічний ефект, що виражається в зменшенні розвитку та ліквідації патологічних явищ похмільного синдрому, а також у поліпшенні переносності алкоголю [142].

Таблиця 3.11

**Показники поведінкових реакцій щурів у тесті «відкрите поле» на тлі застосування засобів для фармакотерапії
алкогольної інтоксикації**

Дослідна група	Перетини квадратів	Вертикальні стійки	Зазирання в отвори	Дефекації	Уринації	Акти грумінгу	Сума всіх видів активності
Одразу після одноразової етанолової інтоксикації							
ІК	32,4±3,8	8,3±1,6	9,7±1,9	0,6±0,3	0,4±0,2	1,4±0,6	52,9±5,5
НК	17,4±4,1 ¹	3,1±0,9 ¹	5,3±1,2	0,7±0,3	1,3±0,4	0,3±0,2	27,9±6,1 ¹
ТЗ-ПП	27,7±3,9	3,4±0,9 ¹	11,9±2,3 ^{2, 3}	0,3±0,2	1,1±0,3	1,0±0,4	45,4±5,3
РЗ-ГА	21,3±4,9	2,7±1,0 ¹	3,4±1,1 ¹	1,0±0,2 ³	1,4±0,4 ¹	0,4±0,3	30,3±7,1 ¹
РЗ-МД	24,0±4,6	3,9±1,4	6,1±1,8	1,4±0,4 ³	1,1±0,3	1,3±0,6	37,9±7,8
Через добу після одноразової етанолової інтоксикації							
ІК	47,5±5,4	13,4±1,7	11,4±1,9	1,4±0,4	0,4±0,2	0,7±0,3	75,0±8,7
НК	28,3±5,8 ¹	7,6±1,7 ¹	9,3±1,9	1,0±0,3	0,7±0,3	0,4±0,3	47,3±9,3 ¹
ТЗ-ПП	43,4±3,2 ²	10,4±1,8	11,7±1,3	0,9±0,3	1,1±0,3	0,7±0,4	68,3±5,3 ²
РЗ-ГА	36,4±4,8	10,9±1,4	11,6±2,0	0,9±0,1	1,1±0,4	0,7±0,4	61,6±6,7
РЗ-МД	40,4±3,6	11,3±1,6	13,0±1,6	1,1±0,5	1,0±0,5	0,6±0,3	67,4±6,8

Примітки:

1. – відмінності, вірогідні щодо тварин групи інтактного контролю ($p < 0,05$);
2. – відмінності, вірогідні щодо тварин групи негативного контролю ($p < 0,05$);
3. – відмінності, вірогідні щодо тварин референтної групи РЗ-ГА (Глутаргін Алкоклін) ($p < 0,05$);
4. – відмінності, вірогідні щодо тварин референтної групи РЗ-МД (Медихронал®-Дарниця) ($p < 0,05$).

Для визначення оптимального складу заявленого комбінованого засобу для усунення симптомів алкогольної інтоксикації було вивчено різні варіанти кількісного складу компонентів. Дані наведено в табл. 3.12 [142].

Таблиця 3.12

**Варіанти кількісного складу заявленого комбінованого засобу
для усунення симптомів алкогольної інтоксикації, мг**

Компоненти	Модель 1	Модель 2	Модель 3	Модель 4	Модель 5
L-глутамінова кислота	450,0	500,0	500,0	450,0	550,0
Ацетилсаліцилова кислота	300,0	325,0	325,0	325,0	350,0
Аскорбінова кислота	90,0	100,0	100,0	100,0	110,0
Гліцин	250,0	300,0	250,0	300,0	350,0
Лимонна кислота безводна	650,0	700,0	700,0	700,0	750,0
Натрію гідрокарбонат	750,0	800,0	800,0	800,0	860,0
Сорбіт	5510,0	5275,0	5325,0	5325,0	5030,0
Маса, мг	8000,0	8000,0	8000,0	8000,0	8000,0

Проведені фармакологічні дослідження свідчать, що зменшення маси компонентів не забезпечує належний рівень фармакологічної активності (модель 1); збільшення маси компонентів недоцільне внаслідок стабілізації терапевтичної дії, рівень якої суттєво не змінюється при збільшенні діючих речовин, а отже, призводить до підвищення собівартості засобу (модель 5); зміна вмісту гліцину та ГК зумовлює порушення балансу фармакологічної активності препарату (моделі 3 і 4) [142].

Оптимальним є модель 2, тому що саме така кількість ГК необхідна для виведення аміаку з центральної нервової системи й подальшого його знешкодження. Кількість АК достатня для реалізації антиоксидантного ефекту. Такий вміст гліцину не лише впливає на поліпшення енергетичного обміну й прискорює детоксикацію, а й зменшує подразнювальний вплив ацетилсаліцилової кислоти на слизову оболонку шлунка. АСК міститься в дозі, достатній для реалізації протизапального і знеболювального ефектів на тлі похмільного

синдрому, проте така доза дозволяє віднести засіб до препаратів з ОТС-сегмента [142].

Висновки до розділу III

1. Вивчено фізичні, фізико-хімічні критерії та характеристики компонентів для створення нового комбінованого препарату для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації та їх сумішей для оцінювання сумісності. Виявлено поєднання компонентів ЛЗ, що викликають відхилення за фізичними та фізико-хімічними критеріями, проведено порівняльний аналіз і визначено причини відхилення критеріїв сумісності компонентів від очікуваних. На підставі результатів досліджень розроблено рекомендації щодо запобігання проблемам під час виробництва та зберігання препарату, пов'язаним із несумісністю компонентів.

2. У результаті комплексних досліджень розроблено склад оригінального комбінованого лікарського засобу у формі порошку шипучого для орального розчину (з розподілом на два саше-пакети з використанням суміші таких АФІ, як гліцин, ГК, АСК та АК) для фармакокорекції симптомів алкогольної інтоксикації. Обґрунтовано вибір наповнювача та коригенту смаку – сорбіту та допоміжних речовин – ЛК безводної і натрію гідрокарбонату – для створення шипучого ефекту орального розчину і більш повного розчинення АФІ.

3. Виконано експериментальні дослідження із визначення основних фармакотехнологічних характеристик АФІ комбінованого препарату. Визначено основні стадії та розроблено критичні параметри технологічного процесу. За отриманими результатами розроблено технологію виробництва препарату.

4. Для підтвердження ефективності нового препарату і вибору кількості АФІ виконано відтворення експериментальної моделі алкогольного гепатиту в щурів, який супроводжується збільшенням активності аланінамінотрансферази в сироватці крові та порушенням білоксинтезувальної функції печінки, активацією вільнорадикального окиснення та виснаженням антиоксидантних систем, що підтверджено динамікою відповідних показників.

5. З'ясовано, що застосування досліджуваного препарату значною мірою запобігає формуванню наслідків токсичного впливу етанолу на функції печінки, що проявляється пригніченням деструкції мембран гепатоцитів, зменшенням рівня продуктів ПОЛ, відновленням показника ВГ та поліпшенням білоксинтезувальної функції печінки. Зазначені ефекти, вірогідно, пов'язані з комплексним впливом амінокислот та аскорбінової кислоти, що містяться в засобі.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

1. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Lytkin D., Briukhanova T., Bezchasnyuk E., Bevz N., Georgiyants V. Study of compatibility of components of a new combined drug for treatment of alcoholic intoxication and its hepatoprotective effect on a model of alcoholic liver injury. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 6 (34). P. 91–100. (Scopus) DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.249880>
2. Rudakova O. V., Gubar S. M., Bezchasnyuk O. M., Bevz N. Y., Smielova N. M., Georgiyants V. A. Розробка складу та технології комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 1. С. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721>
3. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Смілова Н. М., Рудакова О. В. Вивчення сумісності компонентів на етапі фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Управління якістю в фармації*: матеріали XII наук.-практ. конф., м. Харків, 18 трав. 2018 р. Х. : НФаУ, 2018. С. 50–51.

РОЗДІЛ IV

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ КОМБІНОВАНОГО ОРИГІНАЛЬНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Основними етапами стандартизації нового комбінованого препарату для фармацевтичної корекції симптомів алкогольної інтоксикації стали:

- розробка фізико-хімічних і хімічних методик ідентифікації АФІ при сумісній присутності;
- розробка методик визначення супровідних домішок;
- розробка методик кількісного визначення АФІ, що дозволяють точно і надійно знайти кількісний вміст окремого компоненту суміші;
- складання специфікації на порошок шипучий для орального розчину;
- використання запропонованих методик кількісного визначення для проведення фармакотехнологічного випробування однорідність дозованих одиниць;
- використання методик контролю якості для визначення стабільності препарату.

Відповідно до вимог реєстраційного дос'є STD (модуль 3 «Якість») методики і методи випробувань, використані під час виробництва й контролю діючих речовин готового ЛЗ, треба викладати точно й детально, щоб можна було відтворити їх у разі контрольних випробувань. Всі методи випробувань повинні відповідати сучасному науковому рівню, а також бути валідованими.

Для застосування розробленого ЛЗ (порошок шипучий для приготування орального розчину) в медичній практиці розроблено методики контролю якості. Стандартизацію проведено відповідно до вимог загальних статей ДФУ «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» (*Praeparationes liquidae peroraliae*) та «Порошки для орального застосування» (*Pulveres perorales*).

Запропонований ЛЗ «Порошок шипучий для приготування орального розчину» під умовною назвою «Аміноацетаск» складається із двох саше-пакетів такого складу:

Склад пакету № 1		Склад пакету № 2	
Глутамінова кислота	500,00 мг	Гліцин	300,00 мг
Ацетилсаліцилова кислота	325,00 мг	Натрію гідрокарбонат	800,00 мг
Аскорбінова кислота	100,00 мг	Сорбіт	2900,00 мг
Лимонна кислота безводна	700,00 мг		
Сорбіт	2375,00 мг		
Всього	4000,00 мг	Всього	4000,00 мг

Стандартизацію препарату проводили за такими показниками, як опис, ідентифікація, однорідність маси, однорідність дозованих одиниць, супровідні домішки, втрата в масі при висушуванні, мікробіологічна чистота і кількісне визначення [137].

4.1 Ідентифікація активних фармацевтичних інгредієнтів комбінованого оригінального лікарського засобу

Для ідентифікації амінокислот та коригенту смаку (сорбіту) нового засобу використовували метод ТШХ, АСК і АК – метод ВЕРХ. Індивідуальність сполук суміші підтверджували й хімічними методами.

4.1.1 Підбір «зелених» умов для ідентифікації амінокислот у комбінованому лікарському засобі методом ТШХ/ВЕТШХ

Фармацевтичний аналіз ЛЗ передбачає використання хімічних речовин, розчинників і реактивів, які, безперечно, мають негативний вплив як на персонал лабораторії, так і на навколишнє середовище. Досить часто результатом

проведення аналізу стає також значний об'єм відходів, зокрема токсичних органічних розчинників, які вимагають подальшої переробки та утилізації [57, 79, 125, 162, 163].

З огляду на щодалі більшу турботу суспільства про навколишнє середовище сучасні підходи до фармацевтичної розробки й досліджень передбачають імплементацію концепції «*Quality by design*», що означає використання не тільки коректних методик контролю якості ЛЗ, але й урахування сучасних вимог до цих методик з погляду «зеленої хімії». Принципи «зеленої хімії» спрямовані на зменшення ресурсів, енергетичних витрат, мінімізацію часу, дій та операцій під час проведення аналізу, мінімізацію відходів, та, де це можливо, заміну токсичних хімічних речовин на менш шкідливі й безпечні для людини [57, 79, 125, 162, 163].

Поширеними АФІ як моно-, так і комбінованих ЛЗ є амінокислоти, що їх використовують у медицині в разі порушення обміну речовин, захворювань органів шлунково-кишкового тракту, нервової системи тощо [161]. Для контролю якості таких лікарських препаратів у сучасному фармацевтичному аналізі використовують значний арсенал аналітичних методів. Однак основну роль відіграють хроматографічні методи дослідження, які, як відомо, дозволяють розв'язувати одразу декілька питань контролю якості ЛЗ [161].

Так, наприклад, метод ТШХ є важливим фармакопейним експрес-методом для ідентифікації та напівкількісного визначення амінокислот [22, 35, 128, 133]. За рахунок відмінностей у хімічній будові аналізованих сполук, їх розчинності та полярності вони вступають у специфічну взаємодію з нерухомою та рухомою фазами, що зумовлює різні швидкості транспорту речовин [133]. Це дає змогу одночасного розділення як суміші амінокислот, зокрема енантіомерів, так і ЛЗ, що становлять собою комбінації амінокислот з іншими активними фармацевтичними інгредієнтами. Крім того, метод є зручний та економічний у використанні [35, 128, 133].

Альтернативним і більш «зеленим» методом дослідження амінокислот є метод ВЕТШХ. За рахунок використання пластин із меншим розміром зерен сорбенту (від 2 до 10 мкм) досягається ефективне хроматографічне розділення за

використання меншого розміру пластини, об'єму нанесення, а отже, витрачається менший об'єм рухомої фази [35, 133].

Однак процедура проведення дослідження методами ТШХ/ВЕТШХ досить часто передбачає використання токсичних розчинників як для виготовлення рухомої фази, досліджуваних зразків, так і для виявлення одержаних хроматографічних зон [125, 162, 163]. Аналіз амінокислот найчастіше здійснюють у системі нормальнофазової хроматографії, де для дослідження використовують комбінації силікагелю із двох- або трикомпонентними рухомими фазами. Одним із розчинників найчастіше є ацетон, метанол, оцтова і мурашина кислоти, іноді з додаванням аміаку, піридину, хлороформу тощо [35, 133, 161].

Одним із дванадцяти принципів «зеленої хімії», який ще 1998 року обстоювали Р. Т. Anastas та J. С. Warner, є використання більш безпечних розчинників і допоміжних речовин. За останні десятиліття спостерігається тенденція застосовувати більш екологічні альтернативні розчинники для аналітичних досліджень [80].

Отже, важливим питанням під час вибору розчинників постає оцінювання їх екологічності. Наразі в науковій літературі існує безліч настанов і рекомендацій щодо правильного вибору розчинника з урахуванням його впливу на навколишнє середовище, стабільність, горючість та вибухонебезпечність [119]. Проте використання критеріїв оцінювання екологічності вимагає спеціальних інструментів, які дозволять отримати легко інтерпретований та інформативний результат, особливо під час порівняння методик аналізу. З цією метою використовують аналітичний калькулятор GReenness, критерії оцінки якого взято з дванадцяти принципів «зеленої хімії» і трансформовано в уніфіковану шкалу 0-1, а підсумковий бал розраховують на основі принципів важливості. Результатом є піктограма, що демонструє остаточну оцінку, ефективність аналітичної процедури за кожним критерієм, і яку зручно використовувати як для розроблення нової «зеленої» методики аналізу, так і для її порівняння з тими методами, що вже існують [80].

У сучасній науковій літературі вже є публікації, які пропонують для аналізу амінокислот більш «зелені» суміші рухомих фаз, що містять чисту воду, водні розчини поверхнево-активних речовин, етилацетат, *n*-бутанол, *n*-бутилацетат, етиленгліколь тощо і які, як прогнозують, можуть стати домінантними «зеленими елюентами» у хроматографії [80, 161].

Однак через значне різноманіття ЛЗ з амінокислотами, можливий вплив діючих і допоміжних речовин це питання досі залишається відкритим.

Отже, добір умов для ефективного розділення амінокислот, зокрема у складі комбінованих ЛЗ, які дозволять специфічно ідентифікувати досліджувані речовини і які будуть відповідати принципам «зеленої хімії», є актуальним завданням дослідження.

Для ідентифікації амінокислот (глутамінової кислоти та гліцину) у складі ЛЗ, призначеного для лікування алкогольної інтоксикації, методами ТШХ/ВЕТШХ насамперед треба обрати рухому фазу, яка б відповідала принципам «зеленої хімії» та була придатна для розділення амінокислот у комбінованому ЛЗ.

У науковій літературі описано значну кількість рухомих фаз для ідентифікації амінокислот методом ТШХ. Так, наприклад, у ЄФ/ДФУ зазначено, що визначення гліцину та глутамінової кислоти проводять у рухомій фазі *кислота оцтова льодяна – вода – бутанол* (20:20:60) [8, 72], серед інших рухомих фаз поширеними є *ізопропанол – розчин аміаку* (70:30), *ацетонітрил – вода* (10:90), *хлороформ – метанол* (1:1) тощо [35, 133, 161]. Однак на основі аналізу робіт науковців з визначення критеріїв розчинників за їх безпечністю, впливом на здоров'я людини та навколишнє середовище [57, 79, 125, 162, 163], було з'ясовано, що не всі використовувані комбінації розчинників відповідають принципам «зеленої хімії».

У результаті теоретичного оцінювання наведених рухомих фаз за допомогою аналітичного калькулятора «GREEnness» виявлено, що за однакових умов визначення (кількість випробовуваного зразка, тип і кількість дериватизувального реагенту), але за різних типів і об'ємів розчинників та загальної кількості відходів

[120], аналізовані методики мають подібні значення ступеня екологічності (рис. 4.1).

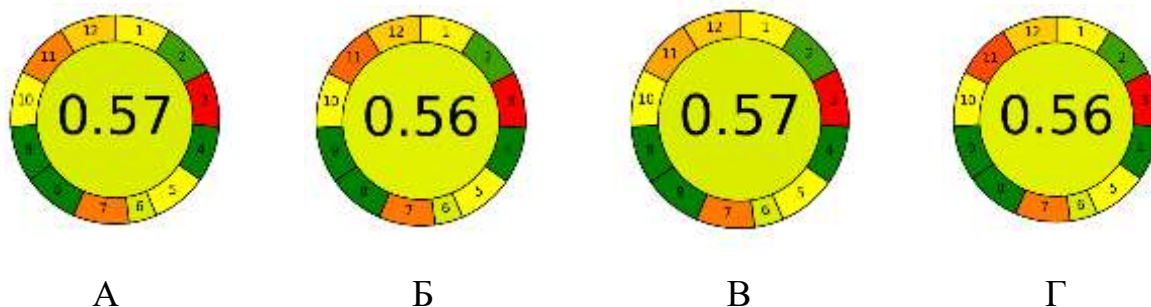


Рис. 4.1 Результати аналізу ступеня екологічності методик визначення амінокислот за аналітичним калькулятором «GREEnness» із використанням різних рухомих фаз: А – кислота оцтова льодяна – вода – бутанол (20:20:60), Б – ізопропанол – розчин аміаку (70:30), В – ацетонітрил – вода (10:90), Г – хлороформ – метанол (1:1)

Відповідно до принципів «зеленої хімії», розробляючи методику визначення під час вибору розчинників, треба уникати утворення великого об'єму відходів і надавати перевагу реагентам, одержаним із відтворюваних джерел. Рекомендованими аналітичними розчинниками (після води), що відповідають цим критеріям, є спирти (етанол, ізопропанол, бутанол тощо) [79, 125, 163].

Оцінюючи наявні рухомі фази для аналізу амінокислот з використанням аналітичного калькулятора «GREEnness», виявили, що комбінації «спирт – вода» мають значення близькі до 1, що свідчить про те, що оцінювана процедура є «зеленішою» [120]. Тому для подальшого дослідження було обрано такі рухомі фази: фаза № 1: *ізопропанол – вода (10:90)* [35, 161]; фаза № 2: *ізопропанол – вода (70:30)* [35, 161]; фаза № 3: *етанол (96 %) – вода (70:30)* [35, 161, 174].

Для вибору найбільш оптимальної рухомої фази з погляду ефективності розділення досліджували суміші СЗ глютамінової кислоти та гліцину (розчин порівняння (*d*)). Для стандартизації умов аналізу обрали відстань 10 см, що її має пройти рухома фаза.

За результатами дослідження з'ясовано, що рухома фаза № 1 є непридатною для розділення суміші глютамінової кислоти та гліцину, а нерозділені хроматографічні зони сконцентровані біля лінії «фініш». Рухомі фази № 2 та № 3 виявилися більш ефективними для виконання визначеного завдання. За класифікацією розчинників за Л. Снайдером, ізопропанол та етанол мають близькі значення полярності (P'). Однак у рухомій фазі № 1 кількість ще більш полярного розчинника – води – утричі проти рухомих фаз № 2 та № 3 перевищує її вміст. З літературних джерел відомо, що в разі зменшення концентрації органічного розчинника рухливість досліджуваних амінокислот збільшується. Цей процес пояснюють імовірним утворенням міцніших водневих зв'язків за аміногрупою з молекулами спирту, що перебувають на поверхні сорбенту, а отже, перевагою процесу сорбції на поверхні сорбенту над асоціацією в розчині [138].

Тож подальші дослідження виконували, використовуючи рухомі фази № 2 та № 3, придатність яких оцінювали за значеннями R_f , R_s , ΔR_f , α , N , H (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Хроматографічні параметри R_f , ΔR_f , R_s , α , N , H на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Рухома фаза / визначувана речовина		R_f	ΔR_f	R_s	α	N	H
Рухома фаза № 2: <i>Ізопропанол – вода (70:30)</i>	Глутамінова кислота	$0,40 \pm 0,01$	0,04	1,00	1,19	1024	0,098
	Гліцин	$0,36 \pm 0,01$				829	0,121
Рухома фаза № 3: <i>етанол (96 %) – вода (70:30)</i>	Глутамінова кислота	$0,58 \pm 0,01$	0,10	2,50	1,50	3364	0,030
	Гліцин	$0,48 \pm 0,01$				2304	0,043

Для розділення речовин хроматографічна система має бути селективною, що означає, що сполуки мають по-різному утримуватися. Розділення двох речовин практично можливе, якщо $R_{f1} > R_{f2}$ та $\Delta R_f \geq 0,1$. Згідно з результатами аналізу (табл. 4.1) у кожній із наведених рухомих фаз R_f першого компонента (глютамінової кислоти) перевищує R_f другого компонента (гліцину). Однак, порівнюючи ΔR_f

хроматографічних зон, з'ясували, що оптимальне значення має рухома фаза № 3. За ступенем розділення (R_s) та селективністю розділення (α) рухома фаза № 3 характеризується більш повним розділенням хроматографічних зон амінокислот. Оцінюючи параметри ефективності розділення (H , N), з'ясували, що за рахунок більшого значення N та меншого значення H у рухомій фазі № 3 частіше встановлюється рівновага між фазами та ефективніше відбувається розділення компонентів аналізованої суміші [138].

Отже, найбільш оптимальна для розділення глютамінової кислоти та гліцину є рухома фаза № 3.

Також з'ясовано, що суміш СЗ глютамінової кислоти та гліцину (розчин порівняння (d)) доречно використовувати для перевірки придатності хроматографічної системи для аналізу: мають виявлятися дві чітко розділені хроматографічні зони [138].

Наступним етапом дослідження був добір оптимального реагенту для виявлення хроматографічних зон амінокислот. Як відомо, ефективність дериватизувального реагенту визначають здатністю до специфічного забарвлення аналізованих сполук. Для ідентифікації амінокислот за ЄФ/ДФУ використовують розчин нінгідрину в суміші оцтової кислоти розведеної і бутанолу (5:95) P і розчин нінгідрину в суміші етанолу 96 % і оцтової кислоти льодяної (5:1) P1 [8, 72].

Оцінюючи їх за принципами «зеленої хімії», виявили, що нінгідрину розчин P має більше значення показника щодо кількості відходів (принцип 7), яке наближається до 1, тобто він є більш «зеленим». І хоча для виготовлення розчину використовують оцтову кислоту льодяну, її кількість у загальному об'ємі виготовленого розчину (у розрахунку на 100 мл) складає менше 0,1 мл, а отже, утворюватиметься менша кількість відходів для переробки [138].

Проте в результаті хроматографування суміші СЗ гліцину та глютамінової кислоти (розчин порівняння (d)) у рухомій фазі етанол (96 %) – вода (70:30) виявили, що найбільш оптимальний є нінгідрину розчин P1, який забезпечує більш чітке та інтенсивне забарвлення хроматографічних зон (рис. 4.2) [138].

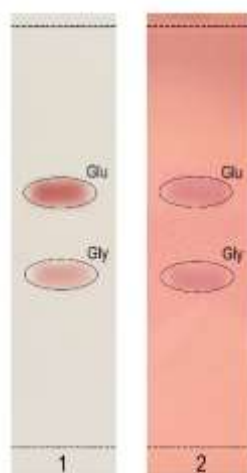


Рис. 4.2 Хроматограма суміші СЗ глютамінової кислоти (Glu) та гліцину (Gly), (розчин порівняння (*d*)), у рухомій фазі *етанол (96 %) – вода (70:30)*: 1 – після оброблення *нінгідрину розчином P1*; 2 – після оброблення *нінгідрину розчином P* на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

У результаті дослідження також з'ясовано, що для оброблення хроматограм витрачається менший об'єм дериватизувального реагенту *нінгідрину розчину P1* і скорочується тривалість нагрівання (хроматографічні зони мають інтенсивне забарвлення вже після 5 хвилин нагрівання за температури 100-105 °C). Отже, з погляду ефективності виявлення аналітичних зон та принципів «зеленої хімії» оптимально для аналізу використовувати *нінгідрину розчин P1* [138].

У запропонованих умовах виконували хроматографічне дослідження саше-пакета № 1 (випробовуваний розчин (*a*)) та саше-пакета № 2 (випробовуваний розчин (*b*)), порівнюючи зі СЗ глютамінової кислоти (розчин порівняння (*a*)) та гліцину (розчин порівняння (*b*)) (рис. 4.3).

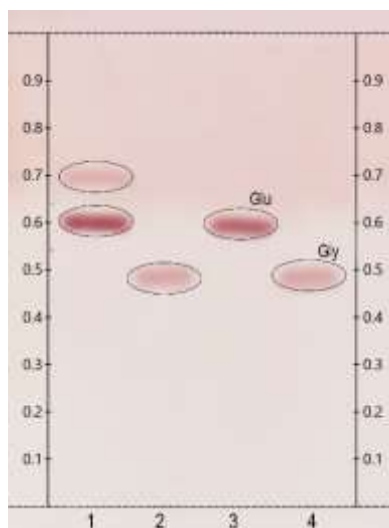


Рис. 4.3 Хроматограма випробовуваного розчину (a) (1); випробовуваного розчину (b) (2); розчину стандартної речовини глутамінової кислоти (Glu), розчин порівняння (a) (3); розчину стандартної речовини гліцину (Gly), розчин порівняння (b) (4) на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

У наведеній рухомій фазі *етанол (96 %) – вода (70:30)* для випробовуваного розчину (a) та випробовуваного розчину (b) проявляються хроматографічні зони на рівні зон СЗ глутамінової кислоти розчину порівняння (a) та СЗ гліцину розчину порівняння (b). Зони стандартних речовин і випробовуваних розчинів мають повне розділення, збігаються за забарвленням і розташуванням, що свідчить про специфічність розділення компонентів сумішей [17, 138].

Як бачимо з результатів хроматографування (рис. 4.4), окрім зон глутамінової кислоти, у випробовуваному розчині (a) є прояв ще однієї неідентифікованої зони. Це свідчить про те, що ще один компонент саше-пакета № 1 вступає в реакцію дериватизації з *нінгідрином розчином P1*. Враховуючи склад досліджуваного саше-пакета, можемо припустити, що в реакцію вступає аскорбінова кислота, яка за рахунок потужних відновних властивостей ($E_0 = +0,18 \text{ В}$) відновлює розчин нінгїдрину. Після повторного дослідження з розчином СЗ аскорбінової кислоти (розчин порівняння (c)) підтверджено, що неідентифікована зона відповідає кислоті аскорбіновій [138].

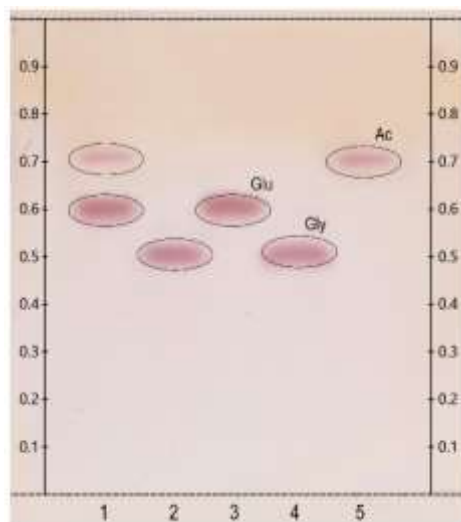


Рис. 4.4 Хроматограма випробовуваного розчину (a) (1); випробовуваного розчину (b) (2); розчину стандартної речовини глутамінової кислоти (Glu), розчин порівняння (a) (3); розчину стандартної речовини гліцину (Gly), розчин порівняння (b) (4); розчину стандартної речовини аскорбінової кислоти (Ac), розчин порівняння (c) (5) на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Отже, у наведених умовах можна одночасно ідентифікувати три компоненти лікарської форми – гліцин, глутамінову кислоту, аскорбінову кислоту. Такий підхід є оптимальний з погляду принципів «зеленої хімії», адже дозволяє зменшити кількість аналітичних операцій під час контролю якості запропонованого ЛЗ.

4.1.2 Вивчення валідаційних характеристик ТШХ-методику ідентифікації амінокислот і аскорбінової кислоти. Підбір умов для визначення на ВЕТШХ-пластині

Наступним етапом дослідження було вивчення робастності методики. Оцінювали вплив умов хроматографування на кінцевий результат (вплив типу нерухомої фази, насиченість камери, об'єму нанесення, відстань від лінії старту до фінішу, вплив розчину для виявлення, стабільність розчинів для нанесення) [21, 22, 133, 138].

Вплив відстані, що має пройти рухома фаза. Порівнювали такі відстані фронту розчинника, як 10, 12 і 15 см (рис. 4.5) [138].

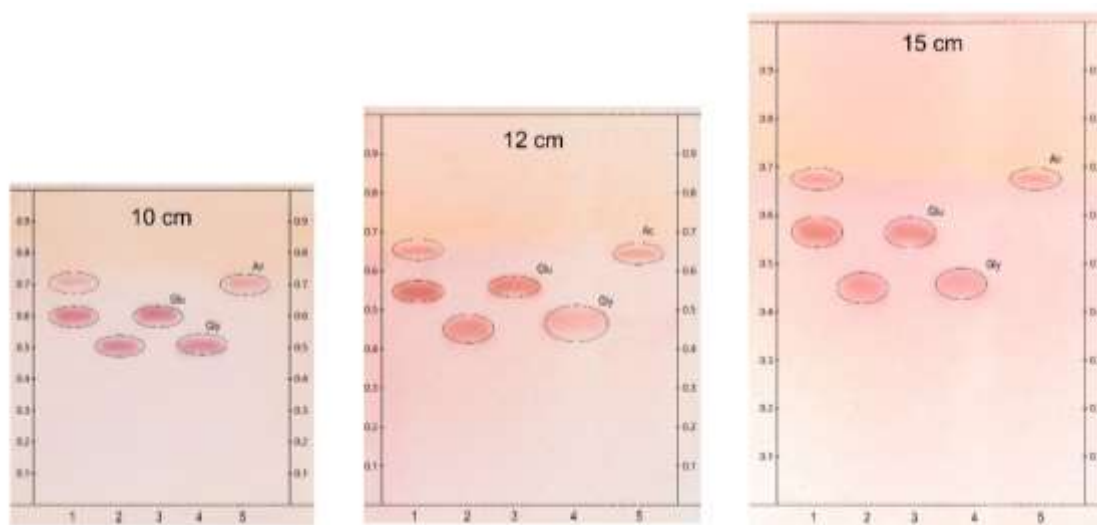


Рис. 4.5 Вплив відстані, що має пройти рухома фаза: випробовуваний розчин (а) (1); випробовуваний розчин (b) (2); розчин стандартної речовини глютамінової кислоти (Glu), розчин порівняння (a) (3); розчин стандартної речовини гліцину (Gly), розчин порівняння (b) (4); розчин стандартної речовини аскорбінової кислоти (Ac), розчин порівняння (c) (5) на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Оптимальним є значення 10 см, тому що збільшення відстані, яку має пройти рухома фаза, призводить до розмивання, подовження отриманих зон та загалом сприяє збільшенню тривалості аналізу, що зменшує загальну оцінку методики аналізу за калькулятором «GREENness» [138].

Вплив типу підкладки. Оцінювали вплив типу підкладки на результат розділювальної здатності компонентів суміші та коливання значень коефіцієнта утримування (R_f) для відповідних зон [21, 22, 133, 138].

На всіх аналізованих пластинках досягнуто розділення компонентів суміші (рис. 4.6, табл. 4.2).

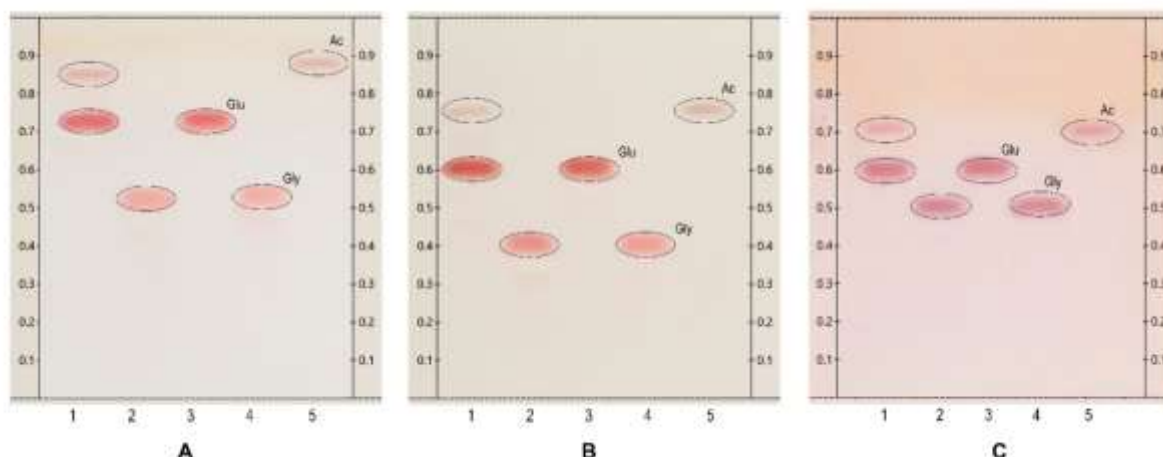


Рис. 4.6 Вплив типу підкладки: А – пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці; В – пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці; С – пластина Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці; 1 – випробовуваний розчин (а); 2 – випробовуваний розчин (b); 3 – розчин порівняння (а); 4 – розчин порівняння (b); 5 – розчин порівняння (с)

Таблиця 4.2

Хроматографічні параметри R_f , ΔR_f , R_s , α , N , H на різних ТШХ-пластинах

Рухома фаза, визначувана речовина		R_f	ΔR_f	R_s	α	N	H
Пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на скляній підкладці	Глутамінова кислота	$0,73 \pm 0,01$	0,21	5,25	2,50	5329	0,019
	Гліцин	$0,52 \pm 0,01$				2704	0,037
Пластина TLC Silica gel 60 (Merck) на алюмінієвій підкладці	Глутамінова кислота	$0,61 \pm 0,01$	0,21	5,25	2,35	3721	0,027
	Гліцин	$0,40 \pm 0,01$				1600	0,063
Пластина Silica gel on TLC (Supelco) на алюмінієвій підкладці	Глутамінова кислота	$0,58 \pm 0,01$	0,10	2,50	1,50	3364	0,030
	Глутамінова кислота	$0,48 \pm 0,01$				2304	0,043

Оцінюючи результати, одержані на пластинах різних виробників із алюмінієвою та скляною підкладками (табл. 4.2), з'ясували, що на пластинах фірми «Merck» відбувається більш повне та ефективне розділення хроматографічних зон [138].

Вплив насичення камери. У результаті дослідження було виявлено, що в попередньо насиченій хроматографічній камері за рахунок утворення газової фази елюенту спостерігається краще розділення хроматографічних зон. Процес елюювання в таких умовах проходить швидше, тобто скорочується час хроматографування [138].

Вплив об'єму розчину для нанесення. Порівнювали результати, одержані за нанесення випробовуваних розчинів та розчинів порівняння різних об'ємів [21, 22, 133, 138].

У ході дослідження порівнювали результати, одержані за нанесення випробовуваних розчинів та розчинів порівняння, об'єми проб яких склали 5, 10, 15 мкл (рис. 4.7) [138].

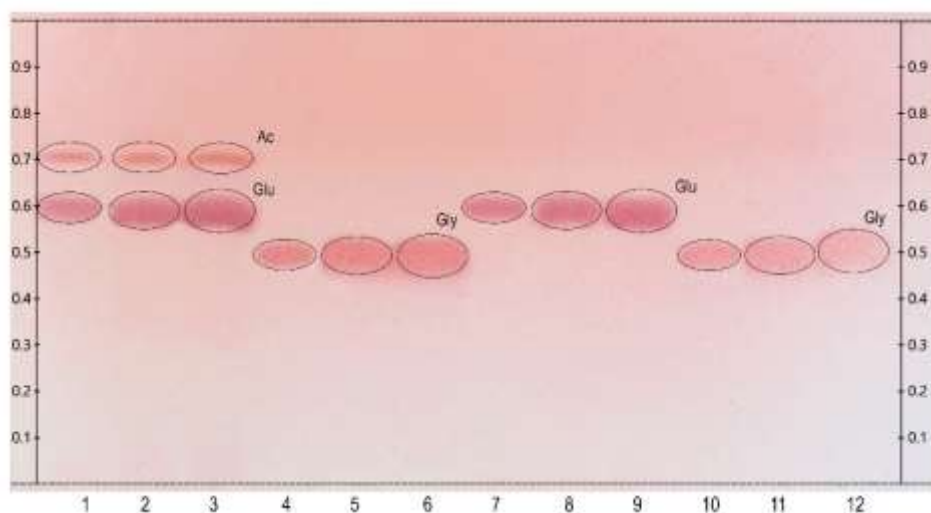


Рис. 4.7 Вплив об'єму розчину для нанесення: 1-3 – випробовуваний розчин (a); 4-6 – випробовуваний розчин (b); 7-9 – розчин СЗ глютамінової кислоти, розчин порівняння (a); 10-12 – розчин СЗ гліцину, розчин порівняння (b): 1, 4, 7, 10 – 5 мкл; 2, 5, 8, 11 – 10 мкл; 3, 6, 9, 12 – 15 мкл на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Як бачимо, оптимальний об'єм для нанесення складає 5 мкл, що становить 5 мкг глютамінової кислоти; 3,25 мкг гліцину; 1,95 мкг аскорбінової кислоти. За збільшення об'єму нанесення спостерігаємо розмиття хроматографічних зон та

зміну їхньої форми. Ширина хроматографічної зони зразків, яка дозволяє отримувати відтворювані результати, складає 10×2 мм [138].

Стабільність розчинів до хроматографування. Стабільність досліджуваних розчинів оцінювали паралельно на одній ТШХ-пластинці. Наносили випробовувані розчини та розчини порівняння за 3 год та безпосередньо перед хроматографуванням [21, 22, 133, 138]. Результати наведено на рис. 4.8. Виявлено, що одержані індивідуальні зони не відрізняються між собою за розташуванням, кольором, інтенсивністю та формою, що свідчить про стабільність аналізованих розчинів упродовж зазначеного проміжку часу [21, 22, 138].

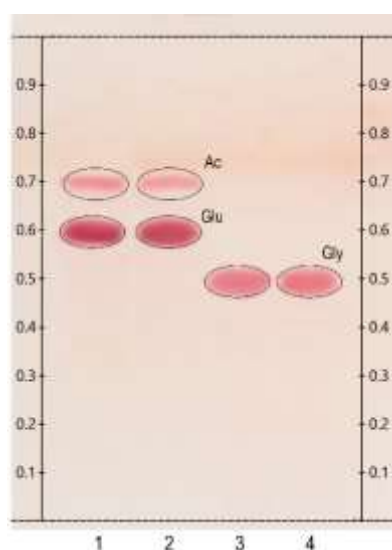


Рис. 4.8 Стабільність випробовуваних розчинів (a) (1, 2) та випробовуваних розчинів (b) (3, 4): 1, 3 – зразки, нанесені за 3 год до хроматографування; 2, 4 – зразки, нанесені безпосередньо перед хроматографуванням на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Стабільність результатів дериватизації. Досліджували вплив умов нагрівання пластинки після елюювання за температури від 100 °C до 105 °C протягом 5-15 хв [21, 22, 133, 138].

Як вже було зазначено раніше, нагрівання пластини за температури 100-105 °C протягом 5 хв є достатнім для процесу дериватизації [138].

Стабільність результатів хроматографування. Оцінювали стабільність результатів через 5, 15, 30 та 60 хв після хроматографування [21, 22, 133, 138].

Оцінювали стабільність результатів через 5, 15, 30 та 60 хв після хроматографування [21, 22, 138]. Упродовж зазначеного часу різниці між досліджуваними зонами виявлено не було.

Прецизійність. Розраховували значення R_f для хроматографічних зон, досліджуючи їх на одній ТШХ-пластинці, на 3-х різних пластинах одного типу, а також аналізуючи у різні дні й різними аналітиками (внутрішньолабораторна прецизійність) [21, 22, 133, 138].

У межах дослідження прецизійності методики розраховували значення R_f для зон ГК та АК (випробовуваний розчин (a)) і гліцину (випробовуваний розчин (b)) на одній ТШХ-пластинці, на 3 пластинках одного типу, виконуючи аналіз в різні дні й різними аналітиками (внутрішньолабораторна прецизійність). Аналіз проводили на ТШХ-пластинах Supelco з алюмінієвою підкладкою [21, 22, 138].

Одержані хроматографічні зони були чітко розділені, ідентичні за розташуванням і забарвленням. Метрологічні характеристики значень R_f для хроматографічних зон, що відповідають ГК, гліцину та АК, становлять:

– на одній пластині:

$$R_f(\text{Ac}) = 0,71; \text{RSD, \%} = 0,81 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,01$$

$$R_f(\text{Glu}) = 0,58; \text{RSD, \%} = 1,00 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,01$$

$$R_f(\text{Gly}) = 0,48; \text{RSD, \%} = 1,21 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,01$$

– на 3 пластинах одного типу:

$$R_f(\text{Ac}) = 0,72; \text{RSD, \%} = 1,61 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,02$$

$$R_f(\text{Glu}) = 0,58; \text{RSD, \%} = 1,72 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,02$$

$$R_f(\text{Gly}) = 0,48; \text{RSD, \%} = 2,08 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,02$$

– внутрішньолабораторна прецизійність:

$$R_f(\text{Ac}) = 0,72; \text{RSD, \%} = 2,90 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,04$$

$$R_f(\text{Glu}) = 0,58; \text{RSD, \%} = 3,45 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,04$$

$$R_f(\text{Gly}) = 0,48; \text{RSD, \%} = 4,31 \%; R_{f \max} - R_{f \min} = 0,04$$

Для розробленої ТШХ-методики аналізу амінокислот та аскорбінової кислоти в сумісній присутності за допомогою аналітичного калькулятора

«GREENness» було розраховано ступінь екологічності (рис. 4.9), що, як ми бачимо, значно перевищує результати в разі використання інших рухомих фаз. Отже, запропонована методика є більш «зеленою» [138].



Рис. 4.9 Ступінь екологічності для розробленої методики визначення амінокислот та аскорбінової кислоти методом ТШХ

Розробка ВЕТШХ-методики. Одночасно розробляли методику для її використання методом ВЕТШХ. Оптимальний об'єм проб для нанесення на пластинку складає 2 мкл; відстань фронту розчинника – 7 см. Результати хроматографування наведено на рис. 4.10.

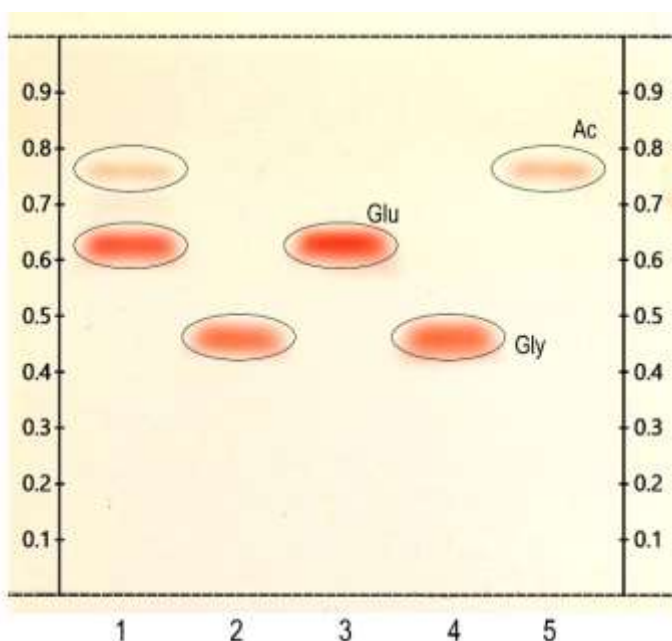


Рис. 4.10 Хроматограма випробовуваного розчину (a) (1); випробовуваного розчину (b) (2); розчину стандартної речовини глутамінової кислоти (Glu), розчин порівняння (a) (3); розчину стандартної речовини гліцину (Gly), розчин порівняння (b) (4); розчину стандартної речовини аскорбінової кислоти (Ac), розчин порівняння (c) (5) на ВЕТШХ-пластині Merck зі скляною підкладкою

Валідовану ТШХ/ВЕТШХ-методику аналізу глютамінової кислоти, гліцину та аскорбінової кислоти наведено нижче [138].

Випробування проводять методом тонкошарової або високоефективної тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27).

Випробовуваний розчин (a): 200 мг порошку із саше-пакета № 1, що еквівалентно 25 мг глютамінової кислоти та 5 мг аскорбінової кислоти, поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 15 мл *води Р*, нагріваючи на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [138].

Випробовуваний розчин (b): 130 мг порошку із саше-пакета № 2, що еквівалентно 10 мг гліцину, поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 15 мл *води Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [138].

Розчин порівняння (a): 25 мг стандартного зразка *глютамінової кислоти* поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 10 мл *води Р*, нагріваючи на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки й перемішують [138].

Розчин порівняння (b): 10 мг стандартного зразка *гліцину* поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 10 мл *води Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [138].

Розчин порівняння (c): 5 мг стандартного зразка *аскорбінової кислоти* поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 10 мл *води Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* і перемішують [138].

Розчин порівняння (d): 25 мг стандартного зразка *глютамінової кислоти*, 10 мг стандартного зразка *гліцину* поміщають у мірну колбу місткістю 25.0 мл, розчиняють у 10 мл *води Р*, нагріваючи на УЗ-бані протягом 12 хв за температури 50 °С, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки й перемішують [138].

Пластинка із шаром силікагелю Р (ВЕТШХ-пластина).

Рухома фаза: етанол (96 %) Р – вода Р (70:30).

Об'єм проб: 5 мкл (2 мкл).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см (7 см).

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують нінгідрину розчином *P1* і витримують за температури від 100 °С до 105 °С протягом 5 хвилин.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (*d*) – на хроматограмі проявляються дві чітко розділені хроматографічні зони.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину (*a*) мають проявлятися дві хроматографічні зони на рівні хроматографічних зон розчину порівняння (*a*) та (*c*); на хроматограмі випробовуваного розчину (*b*) має проявлятися хроматографічна зона на рівні зони розчину порівняння (*b*); зони повинні мати однаковий розмір та забарвлення [138].

4.1.3 Розробка методик ідентифікації ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот при сумісній присутності

Враховуючи принципи «зеленої хімії», які характеризувалися б зменшенням впливу токсичних речовин на навколишнє середовище та виробничий персонал, найменшою кількістю відходів та найнижчою собівартістю, для ідентифікації ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот в пакеті № 1 використовували метод рідинної хроматографії. З огляду на те, що досліджуваний ЛЗ для усунення симптомів алкогольної інтоксикації є комбінованим, одночасне визначення методом ВЕРХ декількох показників дозволить зменшити тривалість аналізу і його собівартість та забезпечити високу точність і відтворюваність результатів вимірювань [142].

У літературі описано методи хроматографічного визначення АСК та її домішок [104], АК та її метаболіту дегідроаскорбінової кислоти [173], АСК в комбінації з іншими ЛЗ [65] і АК у мультивітамінних препаратах.

Мета нашого дослідження – розробити уніфіковану хроматографічну методику, що дозволить одночасно ідентифікувати і визначити кількісний вміст АСК і АК та їх домішок у новому комбінованому ЛЗ.

Основними етапами дослідження стали розроблення хроматографічної методики ідентифікації і кількісного визначення діючих речовин багатокомпонентної ЛФ та її валідація.

Плануючи дослідження, зважали на особливості застосування методу ВЕРХ для пошуку оптимальних хроматографічних умов розділення та обґрунтування вибору уніфікованої рухомої фази: тип нерухомої фази (сорбенту), хроматографічну поведінку АФІ з урахуванням активності незахищених силанолів сорбенту залежно від зміни діапазону рН рухомої фази, а також значення pK_a АФІ.

Вибір та дослідження валідаційних характеристик здійснювали відповідно до вимог ДФУ до хроматографічних методик [143, 144].

При розробці методики одними із ключових завдань є вибір сорбенту та рухомої фази, в умовах яких досягається оптимальне хроматографічне розділення досліджуваних речовин (АК, АСК) та домішок (СК та інших).

Ефективним прийомом для зміни селективності розділення та одночасного контролю стану іонізації аналіту в обернено-фазових умовах ВЕРХ є коригування значень рН. Іонізовані функціональні групи здатні до іонної взаємодії з незахищеними та активними силанолами сорбенту, що впливає на форму піку та його відтворюваність. Крім того, високе значення полярності цих сполук призводить до зменшення їх утримування на сорбенті [143, 144].

У діапазоні рН рухомої фази поблизу значень pK_a АФІ присутні в розчині одночасно в нейтральній та іонізованій формах. Силаноли сорбенту в нейтральному середовищі іонізовані, що збільшує ступінь їхньої взаємодії з полярними функціональними групами, призводячи до утворення сильного хвостового фактору та зниження ефективності колонки. При рН нижче за їх pK_a на 1 – 1,5 одиниці вони перебувають у нейтральному стані, тому підкислення рухомої фази є загальним підходом щодо встановлення вторинних взаємодій [143, 144].

Враховуючи робочий діапазон колонки (рН від 2,0 до 7,5), pK_a АК – 4,10, pK_a АСК – 3,5, pK_a СК – 2,97 та властивості вільних силанолів сорбенту, найбільш прийнятною для визначення досліджуваних АФІ вважаємо рухому фазу з рН 2–3. Тому використовували рухомі фази на основі фосфорної, трифтороцтової кислот та

буферних розчинів [143, 144]. Удалося отримати розділення АФІ з найбільш прийнятною селективністю у розчині фосфатного буфера з рН 3,2.

Для досліджень з вибору типу сорбенту було використано три різні хроматографічні колонки: колонка Hydrosphere C18 фірми YMC розміром 150 × 4,6 мм з передколонкою з розміром частинок 3 мкм; колонка Symmetry C18 фірми Waters розміром 150 × 4,6 мм з передколонкою з розміром частинок 3.5 мкм; колонка Supelcosil LC-NH₂ фірми «Supelco» розміром 150 × 4,6 мм з передколонкою з розміром частинок 3 мкм.

Використовуючи перші дві хроматографічні колонки, дійшли висновку про непридатність цих типів сорбенту для хроматографічного розділення АК, АСК та СК, тому що пік АК виходив у мертвому об'ємі колонки, тобто АК не утримується на цих сорбентах. Лише з використанням колонки розміром 150 × 4,6 мм, заповненої силікагелем амінопропілсилільним для *хроматографії Р* (Supelcosil LC-NH₂, фірми «Supelco») з передколонкою (розмір частинок 3 мкм), та елюювання у рухомій фазі *буферний розчин рН 3,2 – ацетонітрил Р (80:20)* в ізократичному режимі було досягнуто ефективне хроматографічне розділення АК, АСК та СК (порядок виходу піків: 1 – АК, 2 – АСК, 3 – СК). Детектували речовини за довжини хвилі 240 нм; швидкість рухомої фази складала 1,2 мл/хв; температура колонки – 45 °С; об'єм інжекції – 20 мкл. Час хроматографування склав лише 10 хв, що є оптимальним у методі ВЕРХ [143, 144].

Ідентифікувати АК та АСК запропоновано методом ВЕРХ в умовах методики кількісного визначення за часом утримування піків, одержаних для випробовуваного розчину та СЗ. Паралельно проводили хроматографування розчинника (бланк-хроматограма) та розчинів плацебо (рис. 4.11 *a-g*).

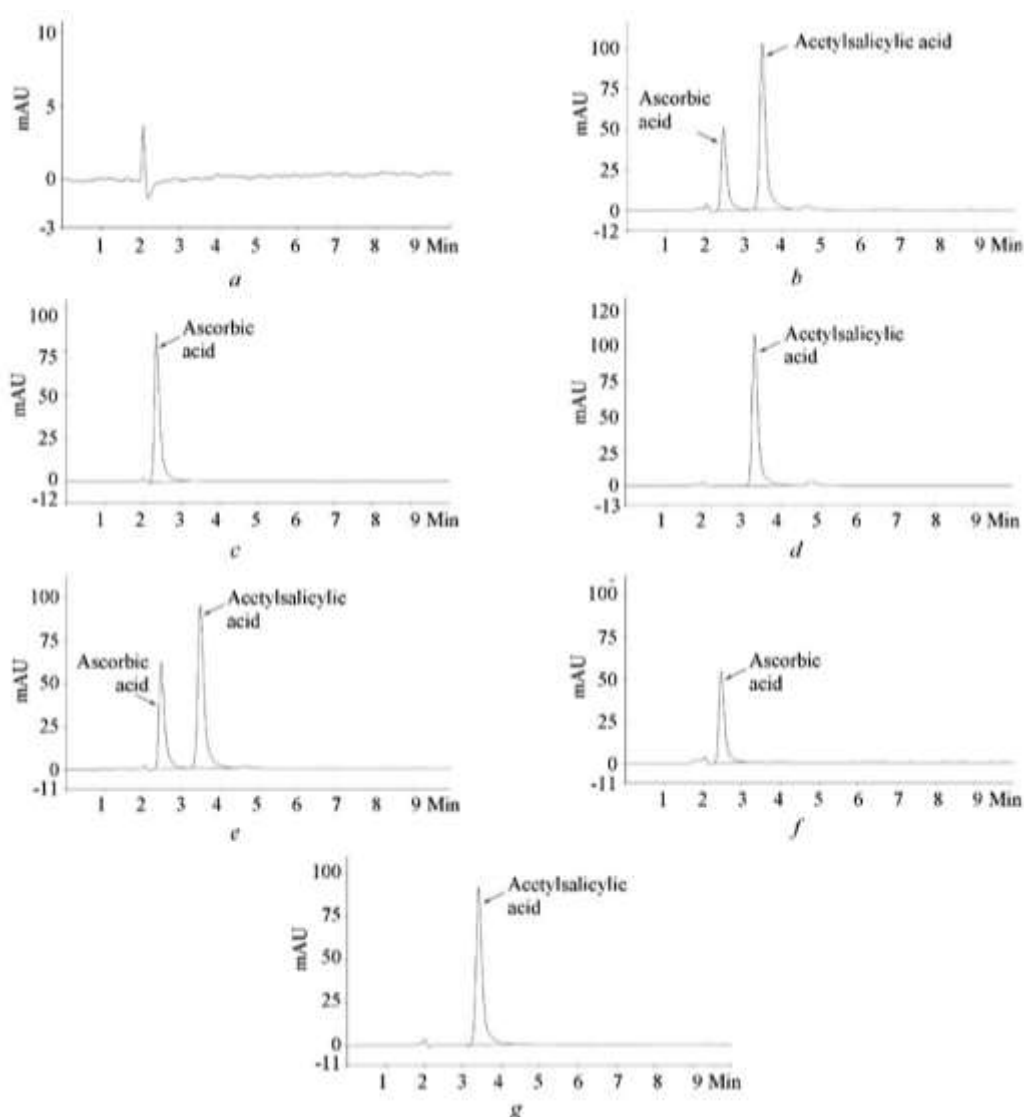


Рис. 4.11 Хроматограми: *a* – бланк-розчину; *b* – випробовуваного розчину; *c* – розчину СЗ АК; *d* – розчину СЗ АСК; *e* – розчину порівняння (*c*); *f* – розчину плацебо без АСК; *g* – розчину плацебо без АК

4.1.4 Ідентифікація сорбіту методом ТШХ

Як вже зазначалося, допоміжною речовиною при виготовленні комбінованого ЛЗ, що призначений для фармакологічної корекції алкогольної інтоксикації, є сорбіт. Він входить до складу обох саше-пакетів та виконує роль коригента смаку та наповнювача ЛФ.

Для ідентифікації сорбіту в ЛЗ використовували уніфіковану методику, що наведена в ЄФ/ДФУ [8, 72]. Результати представлено на рис. 4.12.



Рис. 4.12 Хроматограма випробовуваного розчину (*a*) (1); випробовуваного розчину (*b*) (2); розчину порівняння (3) на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

Результати дослідження (рис. 4.12) свідчать, що на хроматограмі випробовуваних розчинів (*a*, *b*) виявляються хроматографічні зони на рівні зони на хроматограмі розчину порівняння, що підтверджує наявність сорбіту в досліджуваному ЛЗ.

4.2 Визначення супровідних домішок

Одним із найвпливовіших чинників, що зумовлюють якість ЛЗ, є його чистота. Наявність домішок може впливати на фізико-хімічні властивості ЛФ, дозування, фармакологічний ефект, а у випадку забруднення отруйними речовинами – робить використовуваний засіб небезпечним для здоров'я людини. У зв'язку з чим, наявність методик у МКЯ, що дозволяють проводити випробування на наявність домішок і встановлення їх кількості, є обов'язковими при розробці ЛЗ. Причини, що призводять до появи домішок, є зміни самої лікарської речовини, хімічні взаємодії, що відбуваються під час зберігання готового ЛЗ, технологічний процес виготовлення.

Супровідними домішками субстанцій амінокислот – глутамінової кислоти і гліцину – є речовини, що можна виявляти нінгідрином, а основною супровідною домішкою ацетилсаліцилової кислоти є саліцилова кислота [7].

4.2.1 Визначення граничного вмісту домішок амінокислот методом ТШХ

На сьогоднішній день існують різноманітні виробничі процеси, що дозволяють одержати амінокислоти: хімічний та ферментативний синтез, екстракція з білкових гідролізатів, ферментація тощо. Однак жоден із зазначених процесів не забезпечує отримання ідеально чистої субстанції, зумовлюючи наявність різного профілю домішок [35, 128, 161, 174].

ЄФ/ДФУ встановлюють нормування до вмісту допустимих домішок у ЛЗ з амінокислотами на рівні не більше 0,5 %. До таких речовин відносяться сполуки, що відновлюються нінгідрином, визначення яких ЄФ/ДФУ рекомендують проводити методом ТШХ [7, 8, 72].

Визначення граничного вмісту домішок амінокислот у ЛЗ, що призначений для фармакокорекції симптомів алкогольної інтоксикації, проводили за вже розробленою методикою ідентифікації глутамінової кислоти та гліцину методом ТШХ (розділ IV, п. 4.1.1, 4.1.2). Виготовлення випробовуваних розчинів та розчинів порівняння проводили за методикою, що наведена у розділі II. Як нормування до вмісту домішок використали значення 0,5 %, що наведено у ЄФ/ДФУ [727, 8, 72].

Результати дослідження наведено на рис. 4.13.

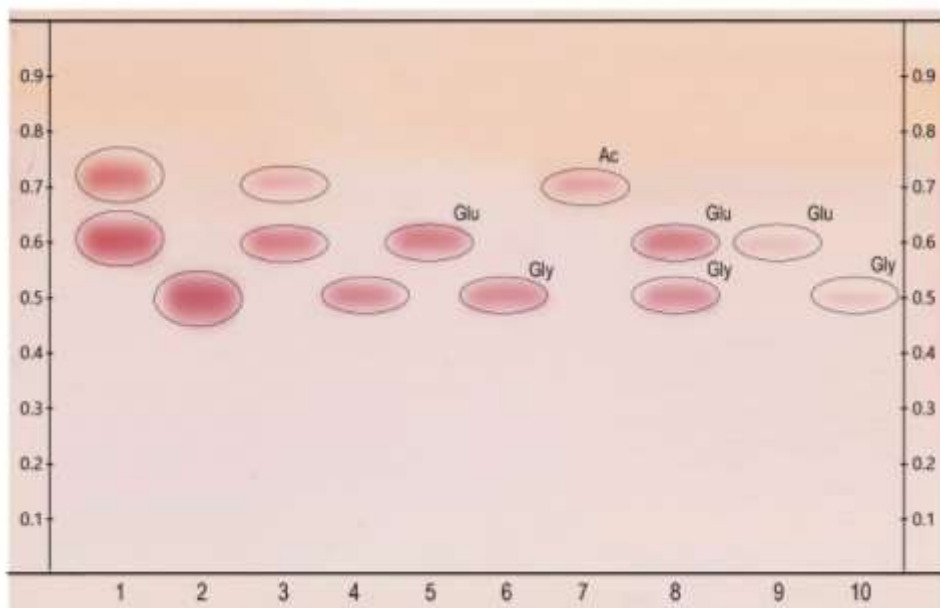


Рис. 4.13 Хроматограма випробовуваного розчину (с) (1); випробовуваного розчину (d) (2); випробовуваного розчину (a) (3); випробовуваного розчину (b) (4); розчину порівняння (a) (Glu) (5); розчину порівняння (b) (Gly) (6); розчину розчину порівняння (c) (Ac) (7); розчину порівняння (d) (8); розчину порівняння (e) (9); розчину порівняння (f) (10) на ТШХ-пластині Supelco з алюмінієвою підкладкою

В результаті проведених досліджень встановлено, що на хроматограмах випробовуваних розчинів (с) та (d) будь-яка зона, крім основної та зони аскорбінової кислоти, не інтенсивніша за зони на хроматограмах розчинів порівняння (e) та (f), тобто вміст речовин-домішок, що відновлюються нінгідрином, не перевищує нормування за вимогами ЄФ/ДФУ [7, 8, 72].

4.2.2 Визначення граничного вмісту домішки саліцилової кислоти методом ВЕРХ

Визначення граничного вмісту домішки саліцилової кислоти у ЛЗ, проводили методом ВЕРХ за методикою, що наведена в розділі II.

Для підтвердження можливості проведення ідентифікації домішок СК та інших домішок в умовах методики кількісного визначення АК та АСК, проводили

хроматографування розчинника (бланк-хроматограма), розчину порівняння (с), розчину порівняння (b), розчину плацебо, розчину для перевірки придатності хроматографічної системи та випробовуваного розчину (рис. 4.14 *a-f*).

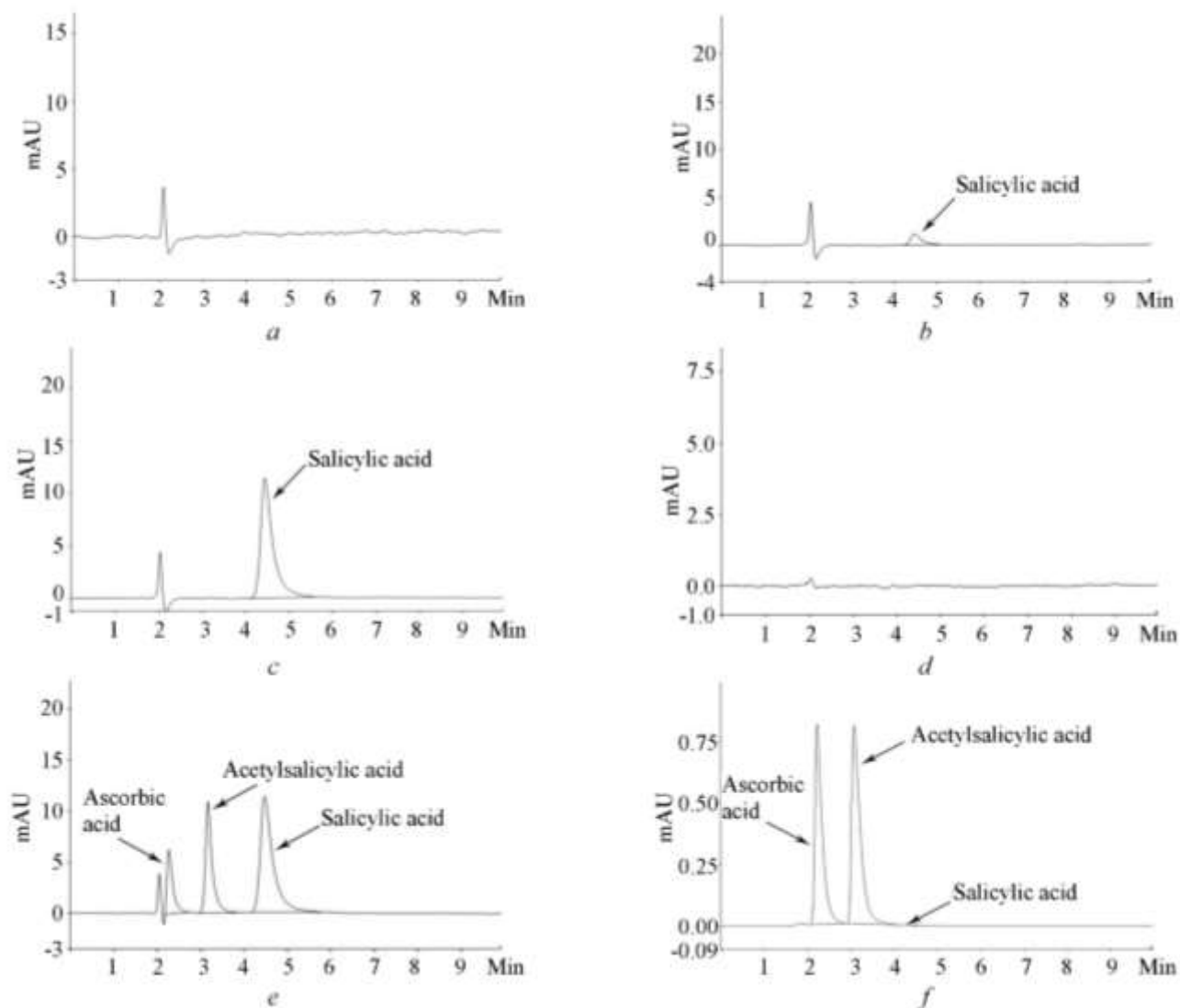


Рис. 4.14 Хроматограми: *a* – бланк-розчину; *b* – розчину порівняння (с); *c* – розчину порівняння (b); *d* – розчину плацебо без АК та АСК; *e* – розчину для перевірки придатності хроматографічної системи; *f* – випробовуваного розчину

Для визначення межі виявлення супровідних домішок порівнювали величини сигналів, отриманих для контрольного експерименту (бланк-розчин) і для зразків з низькими концентраціями сполуки, що визначається (визначення співвідношення сигнал/шум). Межа виявлення (МВ) є достатньою для аналізу і суттєво не впливає на прийняття рішень про якість для граничних випробувань, якщо вона є

незначущою проти граничного вмісту домішки ImL [144]:

$$MB \leq \max MB = 0,32 \times ImL (\text{або } 32\% \text{ от } ImL)$$

Максимальний вміст домішки відповідно до методики визначення має бути не більше 0,5%.

$$MB = 0,32 \times 0,5\% = 0,16\% \text{ від вмісту АСК в препараті.}$$

В умовах методики концентрація випробуваного розчину щодо субстанції становить близько 0,65 мг/мл. Отже, розрахунковий $MB_{imp} \leq 0,16\% \times 0,65 \approx 0,00104$ мг/мл $\approx 1,04$ мкг/мл [144].

Для визначення MB використано співвідношення сигнал/шум, що проводили шляхом порівняння величини сигналів, отриманих для контрольного експерименту (бланк-розчин) і для зразка з низькою концентрацією субстанції. На підставі отриманих даних визначено мінімальну концентрацію, для якої співвідношення сигнал/шум складає 3:1 [144].

Для визначення MB проведено хроматографування бланк-розчину та розведених розчинів СК з концентрацією 0,65 мкг/мл, 0,26 мкг/мл та 0,13 мкг/мл. В умовах запропонованої методики MB складає менше 0,13 мкг/мл, що підтверджено порівнянням отриманих хроматограм (рис. 4.15 **a-d**).

У результаті порівняння хроматограм (рис. 4.15 **a-d**) з'ясовано, що навіть для розчину з концентрацією 0,13 мкг/мл співвідношення сигнал/шум перевищує 3:1, тому MB складає менше 0,13 мкг/мл, що відповідає критерію прийнятності $\leq 1,04$ мкг/мл. Методика визначення кількісного вмісту АФІ є придатною і коректною для визначення супровідних домішок [144].

Відповідно до визначених умов хроматографування була розроблена перевірка придатності хроматографічної системи для кожного показника якості окремо, як для кількісного визначення діючих речовин, так і супровідних домішок.

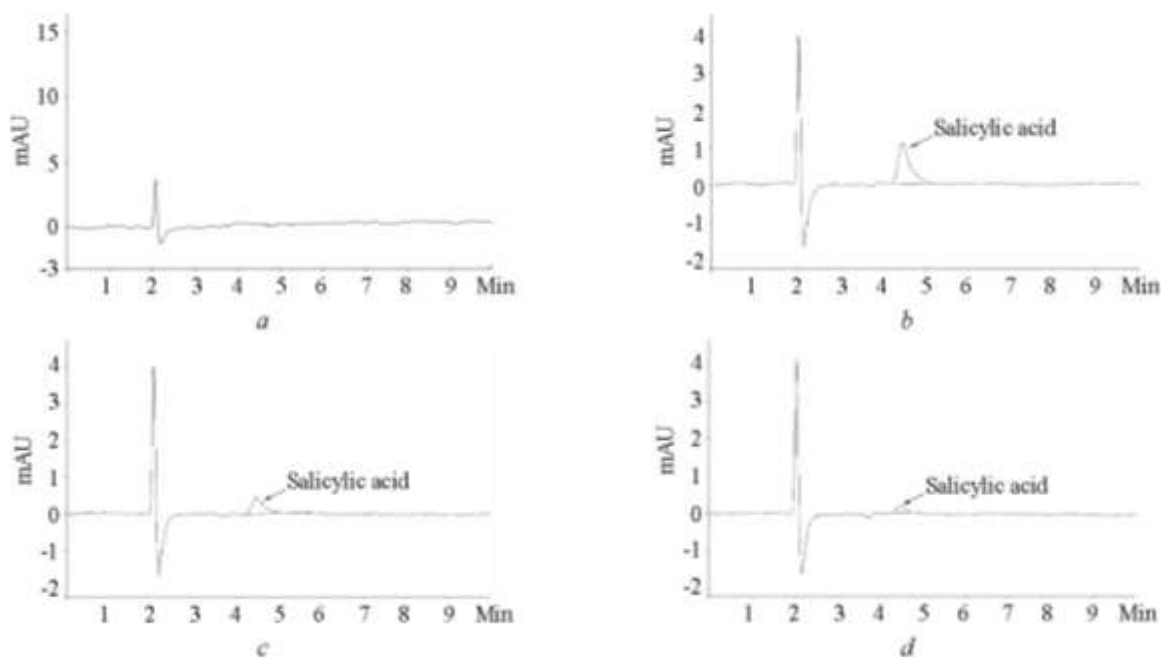


Рис. 4.15 Хроматограми: *a* – бланк-розчину; *b* – розведеного розчину 0,65 мкг/мл; *c* – розведеного розчину 0,26 мкг/мл; *d* – розведеного розчину 0,13 мкг/мл

В умовах визначення супровідних домішок хроматографічна система вважається придатною, якщо для розчину для перевірки придатності хроматографічної системи виконуються наступні умови:

- коефіцієнт симетрії піка СК становить не більше 2,0;
- коефіцієнт розділення між піками АСК та СК становить не менше 3,0.

Для визначення супровідних домішок коефіцієнт симетрії піку СК становив 1.83; коефіцієнт розділення між піками АСК та СК – 3,6, що також задовольняє вимогам до даного тесту [144].

Для ідентифікації домішок використовують хроматограму розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. Час утримування піку СК близько 4,4 хв. Порядок виходу піків та відносні часи утримування: АК (0,71), АСК (1,00), СК (1,41) [144].

Порівняння хроматограм свідчить, що в умовах методики кількісного визначення АК та АСК визначенню домішок не заважають ні розчинник, ні рухома фаза, ні основні речовини, що свідчить про специфічність методики.

4.3 Кількісне визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у порошку шипучому для приготування розчину для орального застосування

4.3.1 Кількісне визначення ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот методом ВЕРХ

Для визначення кількісного вмісту ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот при сумісній присутності розроблено уніфіковану методику ВЕРХ, що наведена в розділі II.

У результаті вивчення валідаційних характеристик методики кількісного визначення АК та АСК з'ясовано, що розрахована повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$ для АК 1,44 % та АСК 1,51 %, що менше $\max \Delta_{AS}$ 1,60 % [8]. Отже, невизначеність пробопідготовки й аналізу загалом забезпечують достатню точність вимірювання [144].

Для валідації запропонованої методики визначали такі валідаційні параметри, як специфічність та межа виявлення.

Специфічність методики підтверджено шляхом порівняння хроматограм розчинів порівняння, випробовуваного розчину, бланк-розчину та розчину плацебо (рис. 4.11 **a-g**). На поданих хроматограмах чітко відокремлюються піки АК та АСК, що збігаються за часом утримування з піками відповідних СЗ. Приблизні часи утримування піків: АК – 2,45 хв, АСК – 3,50 хв. Це свідчить про можливість одночасної ідентифікації АК та АСК під час кількісного визначення АК та АСК. На хроматограмі бланк-розчину і розчину плацебо не виявлено піків, час утримування яких збігався б з часом утримування піків АК та АСК. Отримані результати підтверджують, що методика кількісного визначення АК та АСК у випробовуваному саше-пакеті є специфічною [144].

Вивчаючи робасність, досліджували стабільність розчинів у часі (табл. 4.3). Критерій незначущості проти максимально допускної невизначеності результатів аналізу ($\Delta_{AS} = 1,6\%$) виконується впродовж 1 години, тобто розчини необхідно використовувати свіжоприготовлені (табл. 4.3) [144].

Таблиця 4.3

Результати визначення стабільності розчинів

	0 хвилин	Через 1 годину	Зміни, у %	Через 6 годин	Зміни, у %
АК					
<i>rso</i>	3479235	3456116	0,665	3375006	2,996
<i>test</i>	3667086	3613385	1,464	3465119	5,508
$\Delta_{сер}$			1,06		4,25
АСК					
<i>rso</i>	5618698	5540459	1,392	5476476	2,531
<i>test</i>	6661629	6595630	0,991	6553711	1,620
$\Delta_{сер}$			1,19		2,08

У результаті дослідження лінійності з'ясовано, що значення коефіцієнтів кореляції $r = 0.9995$ (АК) та $r = 0.9988$ (АСК) задовольняє вимоги критерію прийнятності ($r > 0,9981$) (табл. 4.4, рис. 4.16). Отже, у всьому діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % щодо номінальної кількості АК та АСК в ЛЗ методика є лінійною.

Таблиця 4.4

Результати оцінювання параметрів валідації для кількісного визначення
АК та АСК

Параметр	Вимоги, %		Отримане значення, %		Відповідність критерію
	АК	АСК	АК	АСК	
$\Delta_{AS}\%$	$\leq 1,6$		1,51	1,44	Виконується
$ a $	$\leq 2,6$		$ -1,9926 $	$ -0,1692 $	Виконується
S_0	$\leq 0,84$		0,602	0,514	Виконується
r	$> 0,9981$		0,9995	0,9988	Виконується
$ \bar{Z} - 100 $	$\leq 0,2$	$\leq 0,31$	0,02	0,19	Виконується за двома критеріями
	$\leq 0,51$	$\leq 0,51$			
ΔZ	$\leq 1,6$		0,60	0,92	Виконується
Δ_{intra}	$\leq 1,6$		1,41	1,07	Виконується

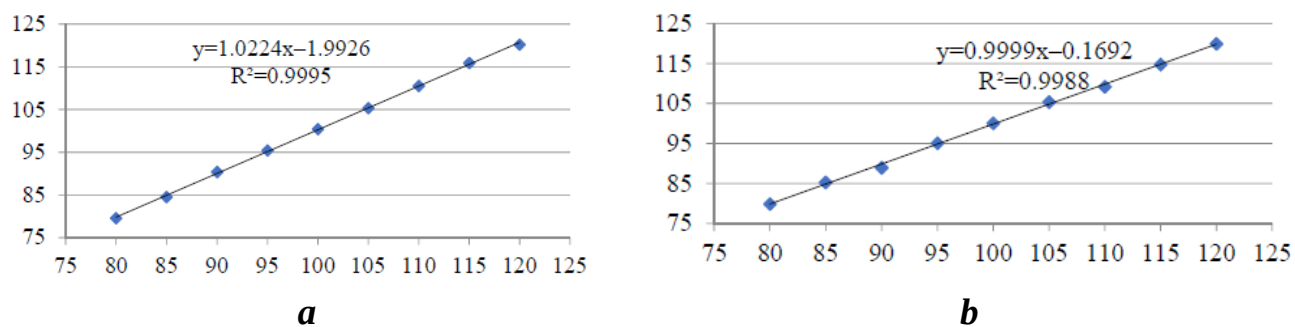


Рис. 4.16 Графіки лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчинів **a** – АК; **b** – АСК, побудовані в нормалізованих координатах

Доведено, що методика характеризується достатньою збіжністю та правильністю в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій (табл. 4.4). Знайдені значення Δ_z для АК – 0,60% та АСК – 0,92 % менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %), що задовольняє критерії прийнятності валідаційного показника «Прецизійність». Систематична похибка методики $\delta = 0,02\%$ (для АК) та $\delta = 0,19\%$ (для АСК) задовольняє вимоги валідаційного показника «Правильність» за двома критеріями – статистичної незначущості (для АК $\leq 0,2$ та для АСК $\leq 0,31$) і практичної незначущості (для АК та АСК $\leq 0,51$) [144].

Дослідження внутрішньолaborаторної прецизійності виконували на 4 пробах одного зразка ЛЗ у різні дні різними аналітиками з використанням різного мірного посуду. Було з'ясовано, що величина відносного довірчого інтервалу (Δ_{intra}) для АК = 1,41 %, а для АСК = 1,07 % задовольняє критерій прийнятності ($\leq 1,6$ %) (табл. 4.4).

Усі розраховані валідаційні параметри відповідають визначеним критеріям, отже, методика є коректною і може бути використана для кількісного визначення АК та АСК в ЛЗ.

В умовах кількісного визначення АК та АСК хроматографічну систему вважали придатною, якщо для розчину порівняння (с) виконано такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком АК та АСК, не менше 1500;
- коефіцієнт симетрії піку АК та АСК становить не більше 1.8;

– коефіцієнт розділення між піками АК та АСК становить не менше 2.0.

Для кількісного визначення АК та АСК ефективність хроматографічної колонки становила для піку АК – 1841, а для піку АСК – 2404; коефіцієнт симетрії піку АК – 1.71, піку АСК – 1.66; коефіцієнт розділення між піками АК та АСК – 3.8, що задовольняє вимоги до цього тесту [144].

4.3.2 Кількісне визначення гліцину методом спектрофотометрії

Амінокислоти – складний об’єкт досліджень, тому що вони мало леткі, мають у структурі кислотні й основні групи, високополярні. З усього різноманіття методів кількісного визначення амінокислот у різних об’єктах можна виокремити чотири основні групи: хроматографічні, спектрофотометричні, титриметричні та електрохімічні методи аналізу [35, 128, 161, 174].

Методи кількісного визначення амінокислот викликають постійний інтерес через важливість біологічних процесів, у яких беруть участь ці сполуки.

Сучасні способи аналізу, попри високу точність визначення, мають значні недоліки: тривалість приготування робочих розчинів, їх токсичність (потенціометричне титрування у неводному середовищі), використання у хроматографічних методах аналізу дорогого обладнання, витратних матеріалів та розчинників кваліфікації «для хроматографії».

У межах розробки цих методів основні зусилля спрямовані на збільшення концентраційної чутливості визначення. Через те що розчини амінокислот зазвичай слабо поглинають УФ- і видиме світло, не мають сильної власної флуоресценції і їхні молекули не мають електроактивних груп, чутливість їх визначення відповідно до спектрофотометричних та електрохімічних методів невисока. Для підвищення чутливості визначення амінокислот проводять їх хімічне перетворення (дериватизацію). Для хроматографічного аналізу цих речовин використовують методи перед- або післяколонкової дериватизації [35, 128].

Амінокислоти належать до речовин, титрування яких у воді утруднене через слабкі кислотно-основні властивості та/або малу розчинність. Амінокислоти

розчиняють у кислоті оцтовій льодяній і отриманий розчин титрують 0,1 М розчином кислоти хлорної. Титрування можна виконувати як з індикатором (кристалічний фіолетовий), так і потенціометрично з використанням індикаторного скляного електрода.

Методика аналізу характеризується високою точністю визначення, але низькою чутливістю. Цей метод має також низку істотних недоліків: використання агресивних, високотоксичних реагентів (зокрема для приготування титранту використовують ангідрид оцтової кислоти); значна тривалість приготування титранту (0,1 М розчину хлорної кислоти – понад 48 год) [35, 128, 161, 174] .

Для аналізу амінокислот широко використовують методи, що ґрунтуються на реакції з нінгідрином [35, 128, 174]. Цю реакцію вперше було відкрито Руманом. Пізніше доведено, що нінгідрин специфічний до аліфатичних або аліциклічних первинних аміногруп. Вторинні, третинні та четвертинні аміни, аміді та амінозаміщені ароматичні сполуки дають слабку реакцію або зовсім не дають. Виняток становить пролін (піролідін- α -карбонова кислота), який утворює з нінгідрином забарвлення жовтого кольору, як вважають деякі дослідники, завдяки розкриттю циклу. Амінокетони з нінгідрином спочатку утворюють жовте забарвлення, яке переходить у пурпурове. Реакцію амінокислот з нінгідрином широко використовують у хроматографічних та спектрофотометричних методах аналізу [140, 141].

З метою розроблення простої та доступної у застосуванні аналітичної методи для фармацевтичної промисловості та контрольно-аналітичних лабораторій з контролю якості лікарських засобів, заощадження часу та фінансових ресурсів під час рутинних лабораторних випробувань, запропоновано спектрофотометричний метод.

Для досягнення зазначеної мети необхідно було:

- визначити умови проведення реакції між гліцином і нінгідрином: час, температурний режим, рН і об'єм буферного розчину;
- обрати аналітичну довжину хвилі забарвленого продукту реакції;

- визначити стабільність отриманої похідної речовини;
- вивчити валідаційні характеристики запропонованої методики.

У якісному аналізі амінокислот широко використовують нінгідринову реакцію. Вивчаючи можливості її використання для кількісного аналізу гліцину методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях, треба оптимізувати умови проведення реакції між гліцином і нінгідрином [140, 141].

Результати вивчення впливу величини рН середовища на інтенсивність поглинання продуктів реакції, отриманих в інтервалі рН від 6,4 до 7,2, засвідчили, що максимальна оптична густина досягається за рН 6,8. Спектри характеризуються чітко вираженим максимумом за довжини хвилі 569 ± 2 нм, положення якого залежить від рН буферного розчину (рис. 4.17).

З огляду на отримані експериментальні дані як аналітичну довжину хвилі було обрано 569 нм.

Через невисоку стабільність продуктів реакції амінокислот з нінгідрином вважаємо за потрібне додавати відновлювальні речовини. Невеликі кількості олова хлориду, титану хлориду, сульфату гідрозину, АК підвищують чутливість реакції амінів з нінгідрином [3, 8].

Нами було обрано АК, яка є найбільш доступним і нетоксичним реагентом. Результати досліджень засвідчили, що введення в реакційну суміш АК збільшує інтенсивність поглинання продукту реакції, тобто підвищує чутливість реакції [140, 141].

Отримані значення оптичної густини досліджуваних розчинів наведено в табл. 4.5.

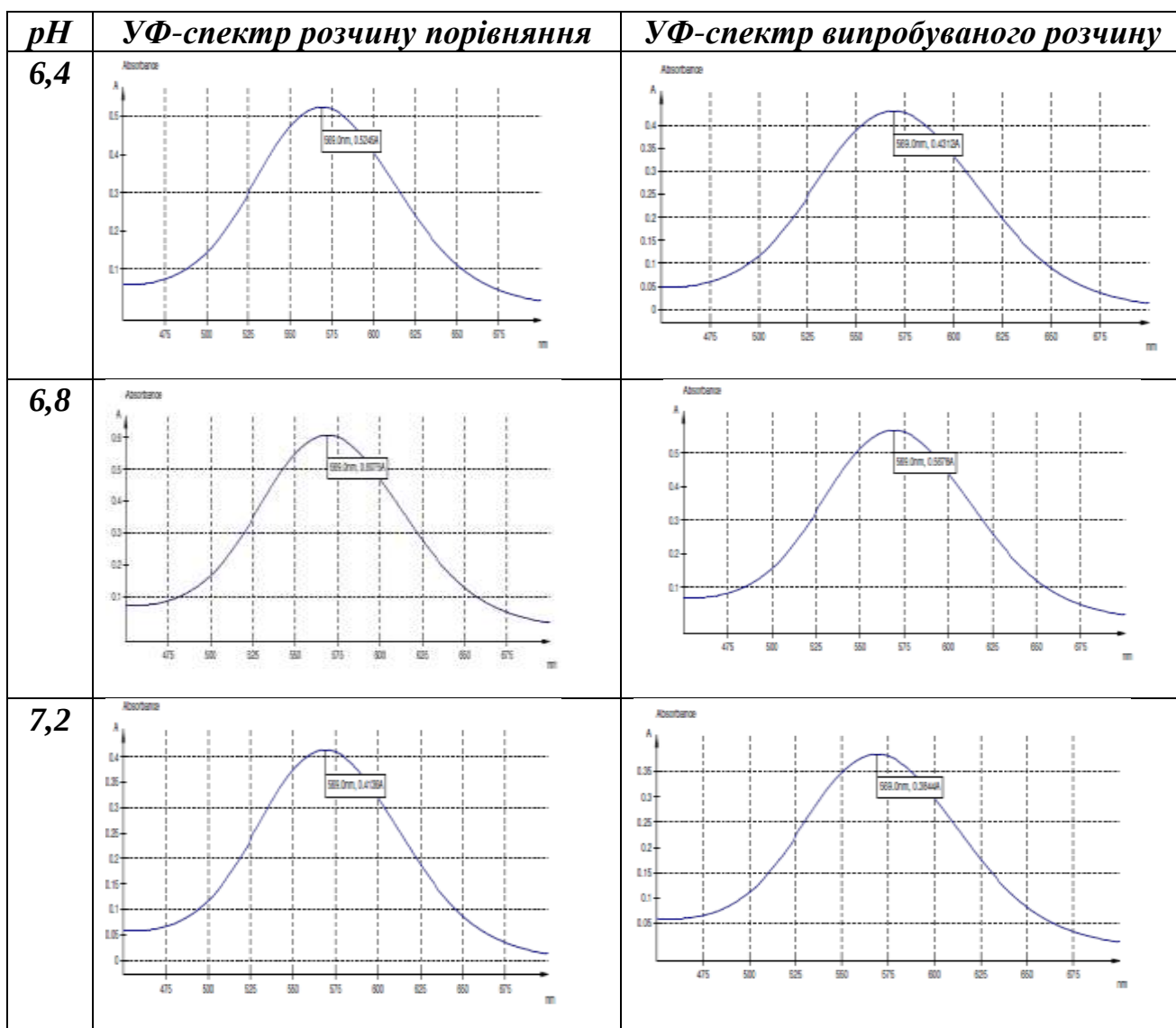


Рис. 4.17 Абсорбційні спектри розчину порівняння та випробуваного розчину за різних pH

Таблиця 4.5

Залежність оптичної густини досліджуваних розчинів від додавання 0,05 % водного розчину АК

Досліджувані розчини	З додаванням 0,05 % водного розчину АК			Без додавання 0,05 % водного розчину АК
	pH 6,4	pH 6,8	pH 7,2	
Випробуваний розчин	0,4314	0,5679	0,3844	0,1644
Розчин порівняння	0,5246	0,6079	0,4138	0,1945

Для отримання стабільних результатів аналізу оптимізовано умови проведення реакції гліцин – нінгідрин; обрано аналітичну довжину хвилі – 569 нм; визначено температурний режим проведення реакції – кип'ятіння на водяній бані впродовж 30 хв; обрано об'єм буферного розчину – 4 мл, рН буферного розчину – 6,8 та введено відновник – АК [140, 141].

Кількісне визначення гліцину в запропонованому препараті виконували на шести зразках. Метрологічні характеристики методики визначення кількісного вмісту гліцину в препараті наведено в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Метрологічні характеристики кількісного вмісту гліцину

m	ν	$X_i, \text{г}$	$X_{cp}, \text{г}$	S^2	S_x	P	$t(P, \nu)$	Δx	$\varepsilon, \%$
6	5	0,287	0,294	$1,417 \cdot 10^{-5}$	0,0015	0,95	2,5706	0,0097	3,29
		0,296							
		0,295							
		0,298							
		0,294							
		0,295							

Як бачимо, систематичну похибку методики можна вважати незначущою, відносна невизначеність окремого визначення для ймовірності 95 % складає 3,29 %.

Валідаційні параметри вивчали за такими показниками, як специфічність, лінійність, правильність, прецизійність і робастність.

Максимально допустима повна невизначеність ($\max \Delta_{AS}$) методики аналізу пов'язана з межами вмісту речовини в препараті. У пакеті вміст гліцину нормували в межах від 0,285 до 0,315 г, тобто допуски вмісту обирали $\pm 5,0 \%$ [140, 141].

Максимально допустима повна невизначеність методики аналізу (4.1):

$$\max \Delta_{AS}, \% \leq 0,32 \cdot 5,0 \% = 1,6 \%. \quad (4.1)$$

Критерій незначущості пробопідготовки (4.2) проти максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу ($\Delta_{AS, insig} \%$):

$$\Delta_{AS, \text{insig}} \% \leq \max \Delta_{AS, \%} \cdot 0,32 = 1,6 \% \cdot 0,32 = 0,51\%. \quad (4.2)$$

Результати розрахування повної невизначеності для розробленої методики наведено в табл. 4.7.

Таблиця 4.7

Результати розрахування невизначеності методики аналізу

Параметр	Результат, %
Повна невизначеність пробопідготовки, $\Delta_{SP} \%$	0,986
Невизначеність кінцевої аналітичної операції, Δ_{FAO} (спектрофотометрія)*	0,70
Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS} \%$ $= \sqrt{(\Delta_{SP} \%)^2 + (\Delta_{FAO} \%)^2}$	1,21

Отже, розрахована повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS} \%$ менше $\max \Delta_{AS}$ ($1,21 \% < \max \Delta_{AS} = 1,6 \%$), що відповідає вимогам до цього параметра.

Для вивчення специфічності було приготовлено розчин плацебо (рис. 4.18), розчин порівняння (розчини СЗ гліцину) (рис. 4.17), випробуваний розчин (рис. 4.18).

Середнє значення оптичної густини розчину плацебо (A_{blank}), зумовлене поглинанням допоміжних речовин, становить: $A_{blank} = 0,0012$; $A_{st} = 0,5676$ [140, 141].

Нерівність виконується, тобто фонове поглинання є незначущим, методика характеризується допускнуою специфічністю: $0,21 \% \leq 0,51 \%$, бо вклад плацебо у сумарне поглинання препарату не перевищує значення (4.3):

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100 \leq 0,51 \% \quad (4.3)$$

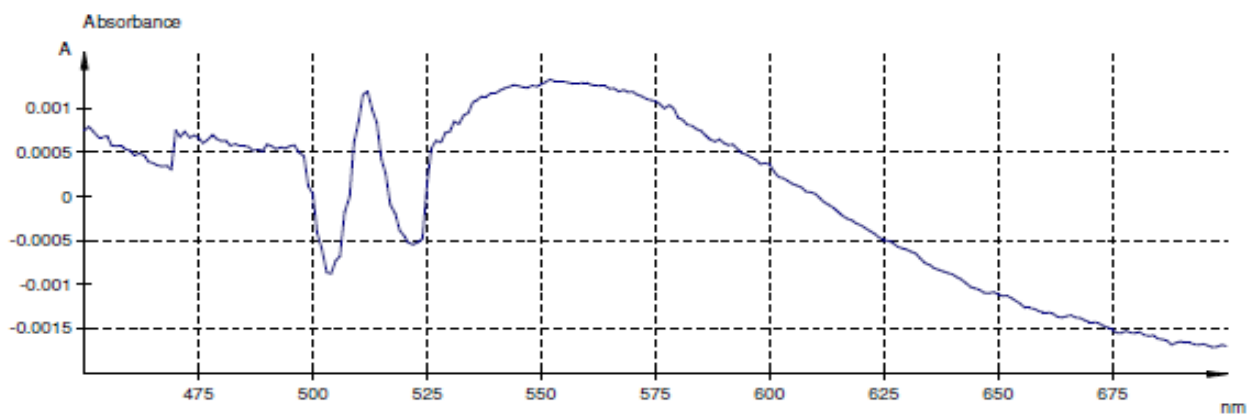


Рис. 4.18 Абсорбційний спектр розчину плацебо

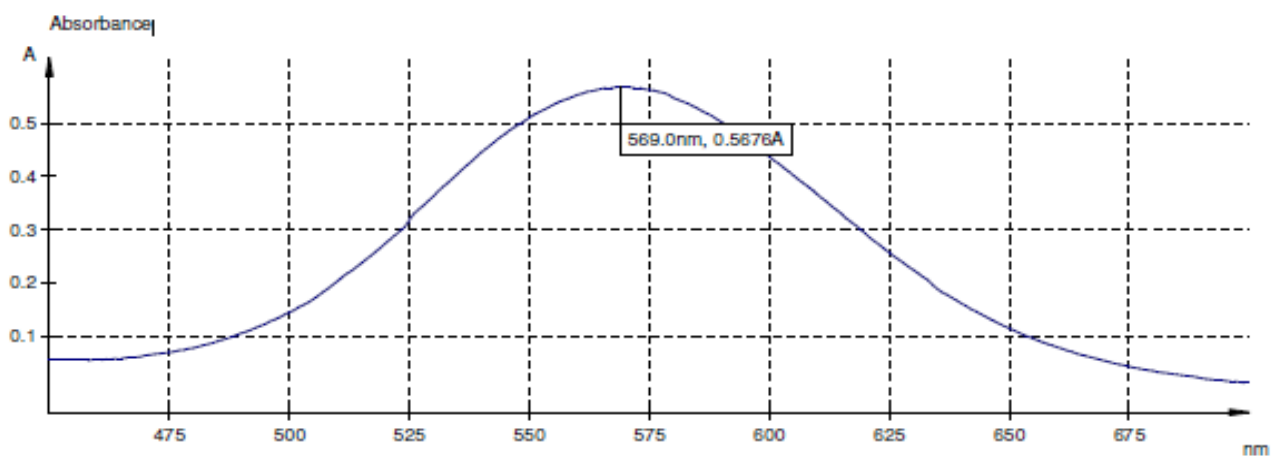


Рис. 4.19 Абсорбційний спектр розчину порівняння

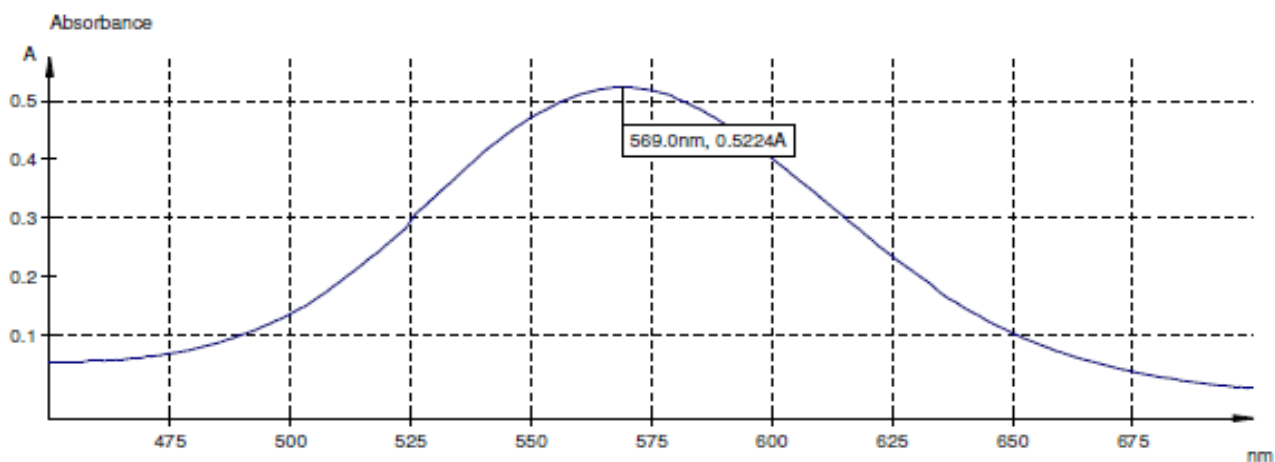


Рис. 4.20 Абсорбційний спектр випробуваного розчину

Методика кількісного визначення повинна бути лінійною в межах діапазону застосування, який перекриває можливі значення концентрацій діючої речовини в діапазоні застосування методики 80-120 % [8]. Для підтвердження лінійності

методики було виготовлено 9 модельних розчинів гліцину, концентрація яких змінюється рівномірно в межах діапазону застосування (крок – 5 %).

На рис. 4.21 подано графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації діючої речовини.

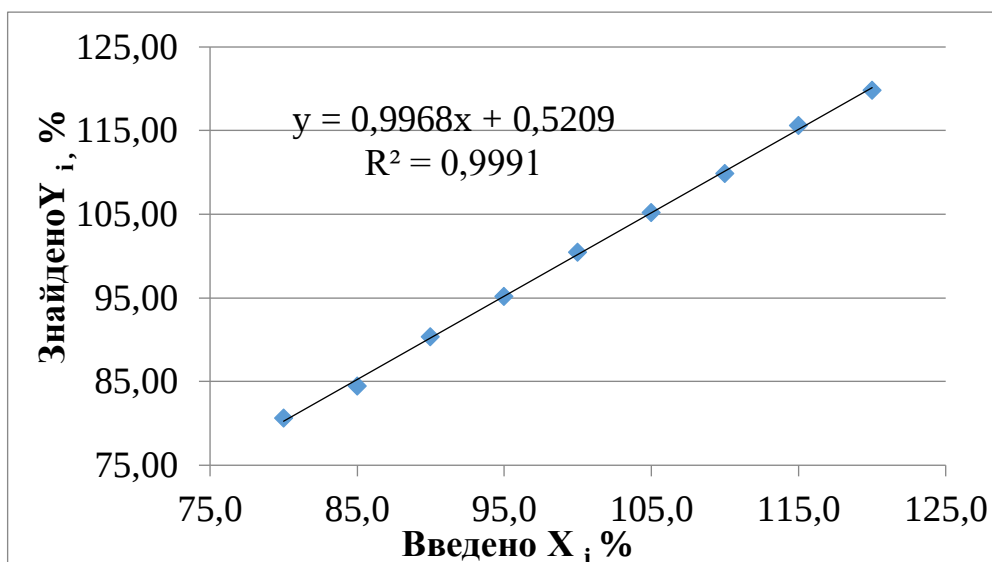


Рис. 4.21 Графік лінійної залежності для продуктів взаємодії гліцину з нінгідринном

Для модельних розчинів методом найменших квадратів розраховано параметри лінійної залежності: вільний член a , залишкове стандартне відхилення S_0 , коефіцієнт кореляції r . Критерії прийнятності наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
$ a $	$\leq 3,8$	0,5209	Виконується
S_0	$\leq 1,27$	0,5734	Виконується
r	$> 0,9957$	0,9991	Виконується

Отримані результати підтверджують, що методика кількісного визначення гліцину в діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % є лінійною.

Виконання критеріїв правильності та прецизійності для визначення гліцину в препараті наведено в табл. 4.9.

Таблиця 4.9

Результати оцінювання правильності та прецизійності методики

Параметр	Значення	Критерій, %		Виконання критерію
		Вимоги до статистичної незначущості	Вимоги до практичної незначущості	
$ \bar{Z} - 100 $	0,21	$\leq 0,27$	$\leq 0,77$	Виконується за двома критеріями
ΔZ	0,82	$\leq 2,4$		Виконується

Методика кількісного визначення гліцину в препараті задовольняє критерії прийнятності валідаційних показників «правильність» та «прецизійність».

Виконання критерію внутрішньолабораторної прецизійності для визначення гліцину в препараті розробленим методом наведено в табл. 4.10.

Таблиця 4.10

Результати оцінювання внутрішньолабораторної прецизійності

Параметр	Вимоги критерію, %	Отримане значення, %	Виконання критерію
Δ_{intra}	$\leq 2,4$	0,99	Виконується

Методика кількісного визначення гліцину в препараті відповідає критеріям прийнятності тесту «внутрішньолабораторна прецизійність».

Вивчаючи робасність, перевіряли стабільність розчинів під час аналізу. Стійкість розчинів гліцину вивчали відразу після приготування, через 15, 30, 45 хв і через 1 год (табл. 4.11).

Таблиця 4.11

Результати дослідження стабільності розчинів гліцину в часі

№	0 хв	Через 15 хв	Зміна пара- метра, %	Через 30 хв	Зміна пара- метра, %	Через 45 хв	Зміна пара- метра, %	Через 1 год	Зміна пара- метра, %
1	0,4518	0,4511	0,15	0,4508	0,20	0,4502	0,35	0,4499	0,42
2	0,4520	0,4510	0,22	0,4509	0,24	0,4503	0,38	0,4502	0,40
3	0,4523	0,4513	0,22	0,4511	0,27	0,4504	0,42	0,4506	0,38
Δ порівн			0,20		0,24		0,38		0,40

Відмінності між отриманими значеннями вмісту гліцину не повинні перевищувати критерій незначущості проти максимально допускної невизначеності результатів аналізу (*As, insig*), тобто 0,51 %. Критерій виконується через 15 хв, 30 хв, 45 хв та 1 год. Згідно з вищевикладеними даними, для кількісного визначення доцільним є використання розчинів упродовж 1 год після приготування [140, 141].

Усі валідаційні параметри відповідають необхідним критеріям прийнятності. Результати доводять, що методика може бути коректно відтворена та придатна для подальшого використання.

4.3.3 Кількісне визначення глютамінової кислоти методом спектрофотометрії

Для кількісного аналізу глютамінової кислоти у складі ЛЗ використовували метод спектрофотометрії, що ґрунтується на реакції взаємодії сполуки зі спиртовим розчином нінгідрину за нагрівання. Пакет № 1, окрім ГК, містить АСК, АК і допоміжну речовину ЛК. Водний розчин пакета має кислу реакцію середовища. У випадку визначення ГК з пакета № 1 для відновлення нінгідрину додатково додавати АК в реакційну суміш недоречно, бо це навпаки призводить до зниження інтенсивності оптичної густини (рис. 4.22 і рис. 4.23).

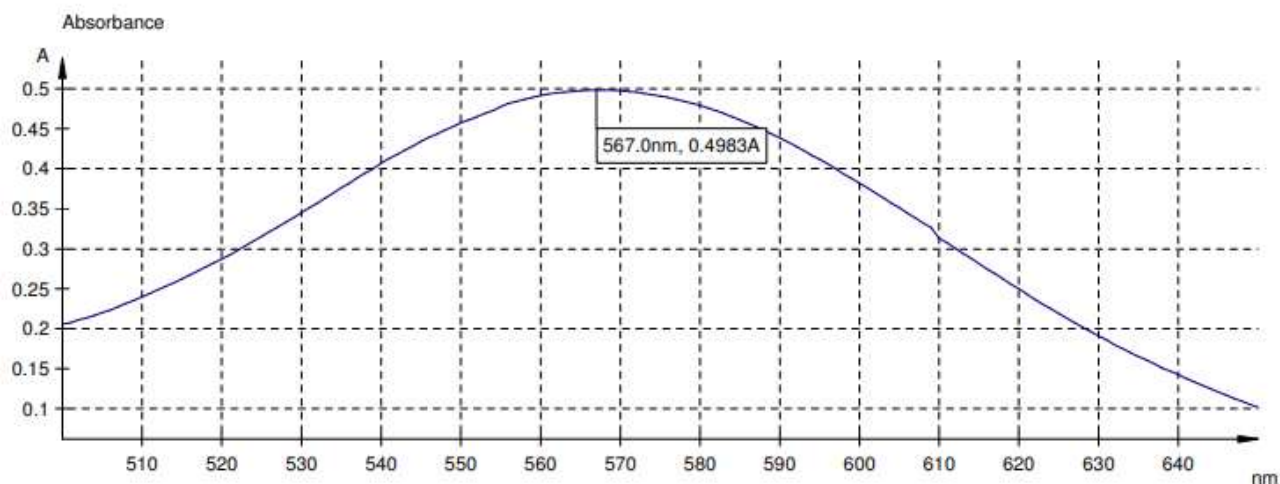


Рис. 4.22 Абсорбційний спектр розчину порівняння

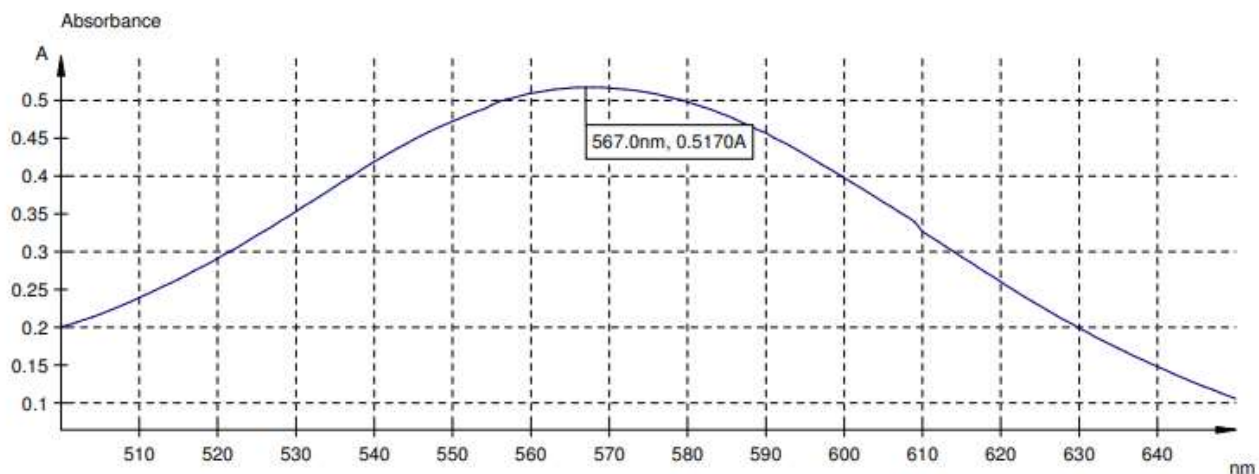


Рис. 4.23 Абсорбційний спектр випробовуваного розчину

Наявність суміші компонентів у пакеті № 1 і інших допоміжних речовин зумовила вивчення таких валідаційних характеристик методики, як специфічність, лінійність, робастність, правильність, прецизійність.

Валідаційні характеристики вивчали за методикою, описаною в розділі 2.

Невизначеність методики аналізу визначали за допусків вмісту $\pm 5,0 \%$, у пакеті вміст глютамінової кислоти нормовано в межах від 0,475 г до 0,525 г.

Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{Sp}), невизначеності кінцевої аналітичної операції (Δ_{FAO}) і повної невизначеності методики аналізу ($\Delta_{As\%}$) наведено в табл. 4.12.

Таблиця 4.12

Розрахунок невизначеності Δ_{Sp} , Δ_{FAO} і $\Delta_{AS}\%$

Операція пробопідготовки	Значення	Невизначеність, $(\Delta),\%$
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Наважка (m)	4000 мг	0,005
Невизначеність зважування	0,2 мг	
Доведення до об'єму	250,0 мл	0,08
Взяття об'єму для розведення	2,0 мл	0,61
Доведення до об'єму	25,0 мл	0,23
Взяття об'єму для розведення	5,0 мл	0,37
Доведення до об'єму	100,0 мл	0,12
<i>Розчин порівняння</i>		
Наважка (m)	50 мг	0,400
Доведення до об'єму	25,0 мл	0,23
Взяття об'єму для розведення	2,0 мл	0,61
Доведення до об'єму	25,0 мл	0,23
Взяття об'єму для розведення	5,0 мл	0,37
Доведення до об'єму	100,0 мл	0,12
Повна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{Sp}\%$		1,42
Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (спектрофотометрія)*		0,70
Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$ $\Delta_{AS}\% = \sqrt{(\Delta_{Sp}\%)^2 + (\Delta_{FAO}\%)^2}$		1,58

Отже, розрахована повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$ менше $\max \Delta_{AS}$ ($1,58 < \max \Delta_{AS} = 1,60\%$) відповідає вимогам до цього параметра.

Попри те, що пробопідготовка впливає на аналітичну методику, повна прогнозована невизначеність аналітичної методики визначення глутамінової кислоти в препараті не перевищує гранично допускної невизначеності результатів аналізу, тому її можна використовувати для аналізу ЛП в інших лабораторіях.

Для вивчення специфічності (вплив плацебо) було виготовлено розчини: плацебо, СЗ ГК, випробовуваний розчин.

Для визначення специфічності методики, зумовленої поглинанням допоміжних речовин, було знайдено середнє значення оптичної густини розчину плацебо (A_{blank}). Вклад плацебо в сумарне поглинання препарату становить (4.4):

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \times 100 = \frac{0,0013}{0,4983} = 0,26\% \leq 0,51\% \quad (4.4)$$

Нерівність виконується, тобто фонове поглинання є незначущим, і методика характеризується допускнуою специфічністю.

Для підтвердження лінійності методики було приготовано 9 модельних розчинів глютамінової кислоти, концентрація яких змінюється рівномірно в межах діапазону застосування методики кількісного визначення від 80 % до 120 % (крок – 5 %).

Розрахунки та критерії (4.5) наведено для нормалізованих величин (табл. 4.13):

$$X_i = C_i/C_{st} \cdot 100 \text{ та } Y_i = S_i/S_{st} \cdot 100 \quad (4.5)$$

Таблиця 4.13

**Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного визначення
глютамінової кислоти згідно з проєктом МКЯ ЛЗ**

№ розчину	С модельного розчину, мг/мл (розрах.)	В % до стандартного розчину $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100$	Значення оптичної густини у максимумі	Середнє значення оптичної густини у максимумі	В % до стандартного розчину $Y_i = S_i/S_{st} \cdot 100$
1	0,0064	80,00	0,5599	0,5602	80,48
			0,5602		
			0,5604		
2	0,0068	85,00	0,5927	0,5928	85,17
			0,5929		
			0,5929		
3	0,0072	90,00	0,6313	0,6314	90,71
			0,6317		
			0,6313		

Продовження таблиці 4.13

№ розчину	С модельного розчину, мг/мл (розрах.)	В % до стандартного розчину $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100$	Значення оптичної густини у максимумі	Середнє значення оптичної густини у максимумі	В % до стандартного розчину $Y_i = S_i/S_{st} \cdot 100$
4	0,0076	95,00	0,6964	0,6646	95,48
			0,6965		
			0,6961		
5	0,0080	100,00	0,6964	0,6963	100,04
			0,6965		
			0,6961		
6	0,0084	105,00	0,7310	0,7308	104,99
			0,7308		
			0,7305		
7	0,0088	110,00	0,7662	0,7659	110,03
			0,7659		
			0,7655		
8	0,0092	115,00	0,8016	0,8013	115,11
			0,8012		
			0,8010		
9	0,0096	120,00	0,8385	0,8379	120,38
			0,8380		
			0,8373		
RSO	0,0080	100,0	0,6961	0,6961	-
			0,6960		
			0,6961		

На рис. 4.24 подано графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, побудований у нормалізованих координатах на основі наведених в таблиці даних (табл. 4.14).

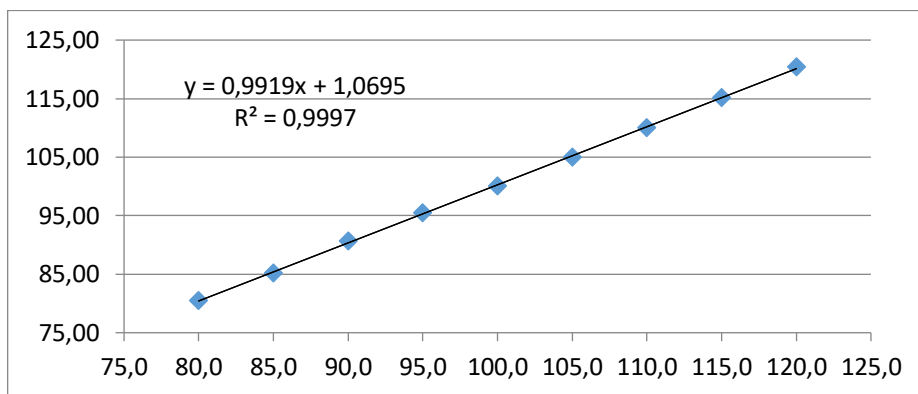


Рис. 4.24 Графік лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для ГК

Параметри лінійної залежності (вільний член a , залишкове стандартне відхилення, коефіцієнт кореляції) наведено в табл. 4.14.

Таблиця 4.14

Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
$ a $	$\leq 2,6$	1,07	Виконується
S_0	$\leq 0,84$	0,53	Виконується
r	$> 0,9981$	0,9996	Виконується

Отримані результати підтверджують, що методика кількісного визначення глютамінової кислоти в діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % є лінійною.

Для визначення правильності в межах діапазону використання аналітичної методики було приготовлено 9 випробовуваних розчинів, з дотриманням всіх стадій аналітичної методики.

Правильність характеризується двома критеріями:

критерій статистичної незначущості (4.6):

$$\delta\% = \left| Z - 100 \right| \leq \frac{\Delta z}{\sqrt{9}} \quad (4.6)$$

де $\delta\%$ – критерій практичної незначущості – у разі, якщо наведене вище співвідношення не виконується, використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки проти максимально допустимої невизначеності аналізу (4.7):

$$|\bar{Z} - 100| \leq \Delta_{AS, in sin g} = 0,51\%. \quad (4.7)$$

Визначення параметрів правильності й розрахунок критеріїв прийнятності для глутамінової кислоти наведено в табл. 4.15.

Таблиця 4.15

Розрахунок параметрів правильності глутамінової кислоти

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(A_i/A_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до введеного $(A_i/A_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$
80,00	80,48	100,60
85,00	85,17	100,20
90,00	90,71	100,79
95,00	95,48	100,50
100,00	100,04	100,04
105,00	104,99	99,99
110,00	110,03	100,03
115,00	115,11	100,10
120,00	120,38	100,32
$Z_{сер}$		100,28
Відносне стандартне відхилення, $s_z\%$		0,29
Відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1.8595 \cdot s_z =$		0,54
Критичне значення для збіжності результатів $\delta\% \leq$		1,6
Систематична похибка $\delta\% = Z_{сер} - 100 $		0,28
Критерій статистичної незначущості $\delta\% \leq \Delta Z = \frac{\Delta \bar{Z}}{\sqrt{n}} = 0,54/3 = 0,18 \quad (0,28 \leq 0,18);$ Якщо не виконується, то критерій практичної незначущості, $\delta\% \leq 0,51 \quad (0,28 \leq 0,51)$		Не виконується Виконується

Виконання критеріїв правильності для визначення ГК у ЛФ методом спектрофотометрії наведено в табл. 4.16.

Таблиця 4.16

Результати оцінювання правильності за двома критеріями

Параметр	Значення	Вимоги до статистичної незначущості	Вимоги до практичної незначущості	Виконання критерію
$ \bar{Z} - 100 $	0,28	$\leq 0,16$	$\leq 0,51$	Виконується за одним критерієм

Методика визначення ГК у препараті задовольняє критерії прийнятності валідаційного показника «правильність».

Прецизійність досліджували на випробовуваних розчинах, приготовлених для визначення критерію правильності. Виконання критеріїв прецизійності методики кількісного визначення ГК у препараті наведено в табл. 4.17.

Таблиця 4.17

Результати оцінювання прецизійності глютамінової кислоти

Параметр	Значення	Критерій	Виконання критерію
ΔZ	0,54	$\leq 1,6 \%$	Виконується

Отже, методика характеризується достатньою збіжністю, бо знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини (0,54 %) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %), що задовольняє критерії прийнятності валідаційного показника «прецизійність».

Для визначення використовували результати дослідження 5 проб одного зразка двома аналітиками в різні дні протягом одного робочого тижня із застосуванням різного мірного посуду. Визначення параметрів внутрішньолaborаторної прецизійності і розрахунок її критеріїв подано в табл. 4.18.

Таблиця 4.18

Визначення параметрів внутрішньолабораторної прецизійності

№	Аналітик №1	Аналітик №2
1	102,78	103,31
2	102,76	103,29
3	102,70	103,27
4	102,70	103,23
5	102,68	103,23
Середнє	102,72	103,26
Дисперсія, s^2	0,004	0,003
Загальне середнє		102,99
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,26
Довірчий інтервал, $(\Delta_{intra} = t(95\%, m \cdot n - 1) \cdot RSD, \% = 2,1318 \cdot RSD, \%)$		0,56

Виконання критеріїв внутрішньолабораторної прецизійності для визначення ГК у препараті методом спектрофотометрії наведено в табл. 4.19.

Таблиця 4.19

Результати оцінювання внутрішньолабораторної прецизійності

Параметр	Вимоги критерію	Отримане значення	Виконання критерію
Δ_{intra}	$\leq 1,6$	0,56	Виконується

Методика кількісного визначення глютамінової кислоти відповідає критеріям прийнятності тесту «внутрішньолабораторна прецизійність».

Оцінюючи робасність методики, вивчали стійкість розчинів порівняння (табл. 4.20) та випробовуваних розчинів (табл. 4.21) відразу після їх приготування, через 15 хв, 30 хв та через 45 хв.

Таблиця 4.20

Визначення стійкості аналітичних розчинів глютамінової кислоти в часі

№	0 хв	Через 15 хв	Зміни параметра, у %	Через 30 хв	Зміни параметра, у %	Через 45 хв	Зміни параметра, у %
1	0,4989	0,4961	0,56	0,4960	0,58	0,4944	0,90
2	0,4986	0,4961	0,50	0,4961	0,50	0,4944	0,84
3	0,4982	0,4959	0,46	0,4960	0,44	0,4943	0,78
$\Delta_{сер}$			0,508		0,508		0,84

Відмінності між отриманими значеннями вмісту ГК не повинні перевищувати критерій незначущості проти максимально допускної невизначеності результатів аналізу ($\Delta_{AS, insig}$), тобто 0,51%. Критерій виконується через 15 хв.

Таблиця 4.21

Визначення стійкості аналітичних розчинів ГК у препараті для приготування орального розчину в часі

№	0 хв	Через 15 хв	Зміни параметра, у %	Через 30 хв	Зміни параметра, у %	Через 45 хв	Зміни параметра, у %
1	0,5193	0,5167	0,50	0,5158	0,67	0,5153	0,77
2	0,5192	0,5170	0,42	0,5158	0,65	0,5139	1,02
3	0,5190	0,5164	0,50	0,5157	0,64	0,5137	1,02
$\Delta_{сер}$			0,48		0,65		0,94

Згідно з вищевикладеними даними для кількісного визначення доцільним є використання розчинів впродовж 15 хв після приготування.

Кількісне визначення глютамінової кислоти в пакеті № 1 виконували на шести зразках. Метрологічні характеристики методики визначення кількісного вмісту ГК у препараті наведено в табл. 4.22.

Таблиця 4.22

Метрологічні характеристики кількісного вмісту ГК

m	ν	$X_i, \text{г}$	$X_{cp}, \text{г}$	S^2	S_x	P	$t(P, \nu)$	Δx	$\epsilon, \%$
6	5	0,478	0,489	$4,67 \cdot 10^{-5}$	0,0028	0,95	2,5706	0,0176	3,60
		0,492							
		0,497							
		0,485							
		0,486							
		0,493							

Як свідчать наведені дані, систематичну похибку методики можна вважати незначущою, відносна невизначеність окремого визначення для ймовірності 95 % складає 3,60 %.

4.4 Дослідження стабільності лікарського засобу

Одним із головних показників якості розробленого препарату є його стабільність, для визначення якої вивчали показники якості розроблених порошків. На підставі проведених досліджень нами було складено проєкт МКЯ на порошок шипучий для орального розчину для фармакологічної корекції симптомів алкогольної інтоксикації. Якість препарату регламентовано за такими показниками: опис, ідентифікація, однорідність маси, однорідність дозованих одиниць, супровідні домішки, втрата в масі при висушуванні, мікробіологічна чистота і кількісне визначення. Показники якості розробленого препарату та його допускні межі наведено в додатку табл. А.3.

З метою вивчення стабільності було виготовлено 3 лабораторні серії (01-03) порошку шипучого для приготування орального розчину та розфасовано в пакет № 1 та пакет № 2 з комбінованого матеріалу для фармацевтичних препаратів (буфлену).

Умови зберігання: за температури 25 ± 2 °C та відносної вологості 60 ± 5 %.

Періодичність випробувань: графік проведення досліджень стабільності капсул з встановленою періодичністю наведено в табл. 4.23.

Таблиця 4.23

Графік періодичності проведення довгострокових досліджень стабільності

Термін зберігання	Вихідне випробування, 0 міс	3 міс	6 міс	9 міс	12 міс	18 міс	24 міс
Програма випробування стабільності	А	В	А	В	А	В	А

Примітки:

А – повна програма, відповідно до якої дослідження проводять за всіма показниками контролю якості, що вказані у проєкті МКЯ.

В – скорочена програма, відповідно до якої дослідження здійснюють вибірково за показниками контролю якості, що вказані у специфікації для визначення стабільності.

Показники, що підлягають контролю, при проведенні випробувань стабільності *за повною програмою А*: опис; ідентифікація; середня маса вмісту саше-пакету; однорідність маси; втрата в масі при висушуванні; мікробіологічна чистота; супровідні домішки; однорідність дозованих одиниць; кількісне визначення.

Показники, що підлягають контролю, при проведенні випробувань стабільності екстракту *за скороченою програмою В*: опис; середня маса вмісту саше-пакету; однорідність маси; втрата в масі при висушуванні; мікробіологічна чистота; супровідні домішки; кількісне визначення.

Програма випробувань стабільності включає показники контролю ЛЗ, що можуть зазнати змін при зберіганні та можуть впливати на якість, безпеку та ефективність препарату, а саме: «Опис», «Ідентифікація», «Середня маса вмісту саше-пакету», «Однорідність маси», «Втрата в масі при висушуванні», «Мікробіологічна чистота;», «Супровідні домішки», «Однорідність дозованих одиниць», «Кількісне визначення».

Результати довгострокового зберігання порошку шипучого для приготування орального розчину наведено в додатку табл. А.4. Встановлено, що протягом усього терміну спостереження всі показники порошоків відповідали вимогам НД.

Отже, рекомендовані термін та умови зберігання становлять 24 місяці за температури не вище 25 °С у пакетах з буфлену.

Висновки до розділу IV

1. У результаті проведених експериментальних досліджень дібрано «зелені» умови для ідентифікації амінокислот (глутамінової кислоти і гліцину) та аскорбінової кислоти в комбінованому ЛЗ методами ТШХ/ВЕТШХ; вивчено валідаційні характеристики ТШХ методики (специфічність, робасність та прецизійність). Визначено, що граничний вміст домішок амінокислот – речовин, що відновлюються нінгідрином – не перевищує нормування ЄФ/ДФУ (0,5 %).

2. Проведено якісне визначення сорбіту у комбінованому ЛЗ методом ТШХ за уніфікованою методикою відповідно до вимог ЄФ/ДФУ.

3. Уперше розроблено уніфікований підхід до методик ідентифікації, кількісного визначення АК і АСК та супровідних домішок методом ВЕРХ у шипучому порошку для приготування орального розчину. У результаті проведення валідації методики кількісного визначення АК та АСК визначено такі валідаційні параметри, як специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, внутрішньолaboratorна точність, робасність, значення яких не перевищують закладених критеріїв прийнятності, тобто методика кількісного визначення АФІ у саше-пакетах валідована, придатна для аналізу як діючих компонентів, так і для визначення супровідних домішок (саліцилова кислота).

4. Розроблено доступну чутливу спектрофотометричну методику кількісного визначення гліцину, засновану на здатності утворювати забарвлені продукти з нінгідрином, що мають максимум поглинання за довжини хвилі 569 нм. Експериментально доведено, що випробування доцільно проводити із застосуванням буферного розчину з рН 6,8 з додаванням для підвищення стабільності продукту реакції кислоти аскорбінової. Визначено температурний режим проведення реакції – 30 хв кип'ятіння на водяній бані. Розчини стабільні впродовж 1 год після приготування. Усі валідаційні параметри відповідають необхідним критеріям прийнятності, методика коректна й придатна для подальшого використання.

5. Результати отриманих валідаційних характеристик запропонованої методики кількісного визначення глютамінової кислоти методом спектрофотометрії, що ґрунтується на реакції з нінгідрином, свідчать про можливість її застосування в аналізі сполуки в присутності таких компонентів суміші, як ацетилсаліцилова, аскорбінова, лимонна кислоти і сорбіт. Максимум поглинання забарвленого продукту, отриманого після додавання буферного розчину з рН 6,8 і проведення реакції впродовж 30 хв на водяній бані, спостерігається за довжини хвилі 567 нм. З'ясовано, що забарвлений розчин стабільний упродовж 15 хв.

6. На підставі комплексу експериментальних досліджень розроблено проєкт методів контролю якості на порошок шипучий для орального розчину.

7. Досліджено стабільність розробленого препарату в процесі зберігання: експериментально доведено термін та умови його зберігання впродовж 24 місяців у пакетах з буфлену за температури не вище 25 °С.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

1. Rudakova O., Gubar, S., Smielova N., Yaremenko M., Bevez N., Georgiyants V. Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 2 (36). P. 81–89. (Scopus). DOI: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.25585>

2. Rudakova O. V., Gubar S. M., Smielova N. M., Kriukova A. I., Bevez N. Y., and Georgiyants V. A. The selection of 'Green' conditions for components identification in a combined medicine by TLC/HPTLC Methods. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 2. P. 52–63. DOI: <http://ophcj.nuph.edu.ua/article/view/259691>

3. Rudakova O., Gubar S., Kriukova, A., Smielova N., Bezchasnyuk E. Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. № 5 (21). P. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294>

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі надано теоретичне узагальнення та практичне розв'язання наукової проблеми, що полягає в розробленні технології порошку шипучого для приготування орального розчину для фармакотерапії симптомів алкогольної інтоксикації, до складу якого входять АФІ: гліцин, глютамінова кислота, аскорбінова кислота, ацетилсаліцилова кислота, а також у розробленні і валідації нових методик контролю якості препарату.

1. Проаналізовано та узагальнено дані інформаційних джерел щодо біохімічних перетворень, які відбуваються в разі алкогольної інтоксикації в організмі, та з'ясовано, що для фармакокорекції зазначеної патології частіше використовують арсенал однокомпонентних ЛЗ, які впливають на окремі симптоми. Кількість комбінованих лікарських засобів, які впливають на усунення всіх наслідків алкогольної інтоксикації, обмежена.

2. Досліджено особливості застосування фізичних і фізико-хімічних методів для ідентифікації, фармакотехнологічних випробувань, визначення чистоти та кількісного вмісту АФІ й допоміжних речовин у запропонованому новому засобі у вигляді порошку шипучого для приготування орального розчину.

3. У результаті проведених комплексних фізико-хімічних і фармакологічних досліджень розроблено склад оригінального комбінованого ЛЗ для усунення симптомів алкогольної інтоксикації і доведено його подальше застосування у вигляді двох саше-пакетів (№ 1 – глютамінова, ацетилсаліцилова та аскорбінова кислоти, сорбіт та лимонна кислота і № 2 – гліцин, сорбіт і натрію гідрокарбонат) для отримання шипучого порошку для приготування орального розчину.

4. Для розробки та обґрунтування технології виготовлення оригінального ЛЗ у формі порошку, який під час розчинення проявляє шипучий ефект, зі сполуками гліцином, глютаміновою кислотою, ацетилсаліциловою кислотою та аскорбіновою кислотою оцінено сумісність діючих і допоміжних речовин шляхом експериментальних досліджень гігроскопічності, хімічної взаємодії / хімічної стабільності та визначення окисно-відновного потенціалу. Доведено, що

фармакотехнологічні характеристики запропонованих порошків (плинність, насипний об'єм, здатність до усадки, насипна густина, густина після усадки) забезпечують прийнятні технологічні показники якості пакета № 1 і пакета № 2 та однорідність фасування препарату за використання методу безпосереднього змішування.

5. Фармакологічні дослідження порошку шипучого для приготування орального розчину свідчать про гепатопротекторний і детоксикаційний ефекти, що покращують загальний стан, виявляє загальну алкогольпротекторну дію, яка не поступається сучасним комерційним засобам для фармакокорекції алкогольної інтоксикації. Фармакологічні випробування свідчать, що склад заявленого комбінованого засобу є оптимальний, бо зменшення маси компонентів не забезпечує належний рівень фармакологічної активності препарату, а збільшення кількості компонентів до максимально можливої терапевтичної дози призводить до стабілізації фармакологічного ефекту.

6. У результаті експериментальних досліджень дібрано «зелені» умови для ідентифікації амінокислот (глутамінової кислоти і гліцину) та аскорбінової кислоти в комбінованому ЛЗ методом ТШХ, вивчено валідаційні характеристики методики – специфічність, робасність та прецизійність. Дібрано умови для використання методики на ВЕТШХ-пластинах. Методом ТШХ визначено, що граничний вміст домішок амінокислот – речовин, що відновлюються нінглідрином – не перевищує нормування ЄФ/ДФУ (0,5 %). Проведено ідентифікацію сорбіту у комбінованому ЛЗ методом ТШХ за уніфікованою методикою відповідно до вимог ЄФ/ДФУ.

7. Розроблено нову методику ідентифікації, кількісного визначення ацетилсаліцилової і аскорбінової кислот за сумісної присутності та супутніх домішок в порошку шипучому з використанням високоефективної рідинної хроматографії. У результаті валідації методики кількісного визначення АК та АСК визначено такі валідаційні параметри, як специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, внутрішньолaboratorна точність, робасність, показники яких не перевищують закладених критеріїв прийнятності, тобто методика кількісного

визначення АФІ у саше-пакетах валідована і придатна для аналізу. У результаті валідації методики визначення супровідних домішок (саліцилова кислота) визначено такі валідаційні параметри, як специфічність та межа виявлення, показники яких задовольняють вимоги щодо нормованих критеріїв прийнятності. Методика визначення кількісного вмісту АФІ є придатною і коректною також і для визначення супровідних домішок.

8. Кількісний вміст амінокислот у комбінованому ЛЗ запропоновано визначати абсорбційною спектрофотометрією у видимій ділянці, яка ґрунтується на реакції утворення забарвлених продуктів зі спиртовим розчином нінгідрину. Доведено, що реакція між амінокислотами і нінгідрином відбувається впродовж 30 хв на киплячій водяній бані, з додаванням різної кількості буферного розчину з рН 6,8 залежно від вмісту пакета. Для підвищення стабільності реакцію взаємодії гліцину з нінгідрином доцільно проводити з додаванням аскорбінової кислоти. З'ясовано, що стійкість забарвленого продукту реакції між гліцином і нінгідрином спостерігається впродовж 1 год, між глютаміною кислотою і реагентом – 15 хв. Основні валідаційні характеристики: робастність, лінійність, правильність, прецизійність – підтверджують можливість використання цих методик у присутності інших компонентів препарату.

9. Запропоновано методики контролю якості ЛЗ. Визначені органолептичні та фізико-хімічні показники дозволяють контролювати якість у процесі виробництва та зберігання. Визначено термін та умови зберігання порошку шипучого для приготування орального розчину – протягом 24 місяців за температури не вище 25 °C у саше-пакетах з буфлену.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Буткевич Т. А., Сятиня М. Л., Попович В. П. Визначення фізичних та фармако-технологічних властивостей сухого порошку біомаси *flammulina velutipes*. *Фармацевтичний часопис*. 2016. № 2. С. 11–15.
2. Буфлен – упаковка для лікарських препаратів, косметики і харчових концентратів. *Укр-Комбі-Пак*. URL: https://ukr-kombi-ras.com.ua/catalog/combi_foil/ (дата звернення: 04.02.2022 р.).
3. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Харьков : Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. 396 с.
4. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Рудакова О. В. Визначення стратегії та підходів фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи*: матеріали II Всеукр. наук. конф., м. Житомир, 16 трав. 2018 р. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. І. Франка 2018. С. 223–225.
5. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Сметлова Н. М., Рудакова О. В. Вивчення сумісності компонентів на етапі фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Управління якістю в фармації*: матеріали XII наук.-практ. конф., м. Харків, 18 трав. 2018 р. Х. : НФаУ, 2018. С. 50–51.
6. Губарь С. Н., Рудакова О. В., Безчаснюк Е. М., Георгиянц В. А. Обоснование выбора аминокислот и их стандартизация в оригинальном лекарственном средстве антиалкогольного действия. *Роль и место инновационных технологий в современной медицине*: материалы 66-ой годичной науч.-практ. конф. с междунар. уч. ТГМУ им. Абуали ибни Сино, г. Душанбе, 23 нояб. 2018. Т. 2. С. 356–357.
7. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків:

- Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т.2. 724 с.
8. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
 9. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
 10. Доклинические исследования лекарственных средств : метод. рек. / под ред. А. В. Стефанова. Киев : Авиценна, 2002. 528 с.
 11. Крутських Т. В., Кобилінська В. І., Шаламай А. С. Вивчення допоміжних речовин для створення оромукозальних таблеток на основі субстанції альтабор. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 1. С. 26–30.
 12. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика / МОЗ України. Київ, 2009. 27 с.
 13. Маслій, Ю. С., Рубан О. А., Ковалевська І. В. Вибір інтенсивного підсоложувача у складі лікувальної жувальної гумки, що розробляється. *Фармацевтичний журнал*. 2018. № 5–6. С. 70–79.
 14. Міжнародна статистична класифікація хвороб та споріднених проблем охорони здоров'я. Десятий перегляд. Київ : Здоров'я, 2001. Т. 3. 817 с.
 15. Наказ МОЗ України № 944 від 14.12.2009 року «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів» URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10>
 16. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. Київ : Авіцена, 2002. 196 с.
 17. Підбір «зеленої» рухомої фази для ефективного розділення глютамінової кислоти та гліцину у комбінованому лікарському засобі методом ТШХ / О. В.

- Рудакова, С. М. Губарь, Н. М. Сметлова, Н. Ю. Бевз, А. І. Крюкова, В. А. Георгіянц. *Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво* : VI Міжнар. наук.-практ. конф., м. Шостка, 23 – 25 лист. 2022 р. м. Суми : Сумський державний університет, 2022. С. 235–239.
18. Рудакова О. В., Губарь С. М., Крюкова А. І., Сметлова Н. М., Безчаснюк О. М. Обґрунтування вибору тіоктової кислоти та її стандартизація в оригінальному лікарському засобі антиалкогольної дії. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського*: матеріали підсумк. LXII наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 13 черв. 2019. Тернопіль : ТНМУ, 2019. С. 96–97.
 19. Скрипник І. М., Маслова Г. С. Алкогольна хвороба печінки: шляхи підвищення детоксикаційної функції печінки. *Сімейна медицина*. 2015. № 6 (62). С. 7–15.
 20. Технология лекарств промышленного производства : учебник для студ. высш. учеб. завед.: в 2 ч. / В. И. Чуешов, Е. В. Гладух, И. В. Сайко и др. Винница : Нова Книга, 2014. 696 с.
 21. Хохлова Е. А., Здорик А. А., Георгиянц В. А. Разработка и валидация методики идентификации флавоноидов в настойке календулы. Сообщение 1. *Химия растительного сырья*. 2015. № 1. С. 133–139.
 22. Хохлова К. О., Вишневська Л. І., Гарна С. В., Котов А. Г. Розробка та валідація методики ідентифікації ізофлавоноїдів і тритерпенових сапонінів у настійці «Атерофіт-норма» методом тонкошарової хроматографії. *Фармаком*. 2013. № 1. С. 38–52.
 23. A mouse model of the regression of alcoholic hepatitis: Monitoring the regression of hepatic steatosis, inflammation, oxidative stress, and NAD⁺ metabolism upon alcohol withdrawal / H. Kang et al. *The journal of nutritional biochemistry*. 2022. Vol. 99. P. 108852.
 24. A prospective evaluation of thiamine and magnesium status in relation to clinicopathological characteristics and 1-year mortality in patients with alcohol

- withdrawal syndrome / D. Maguire et al. *Journal of translational medicine*. 2019. Vol. 17, № 1. P. 1–13.
25. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency / J. Victor V. Costardi et al. *Revista da associação médica brasileira*. 2015. Vol. 61, № 4. P. 381–387.
 26. Abosamak N. E. R., Gupta V. Vitamin B6 (pyridoxine). StatPearls [Internet]. 2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557436/>
 27. Actions of alcohol in brain: genetics, metabolomics, GABA receptors, proteomics and glutamate transporter GLAST/EAAT1 / M. A. Kashem et al. *Current molecular pharmacology*. 2021. Vol. 14, № 2. P. 138–149.
 28. Alcohol affects brain functional connectivity and its coupling with behavior: greater effects in male heavy drinkers / E. Shokri-Kojori. *Molecular psychiatry*. 2017. Vol. 22, № 8. P. 1185–1195.
 29. Alcohol dependence and withdrawal impair serotonergic regulation of GABA transmission in the rat central nucleus of the amygdala / S. Khom et al. *Journal of Neuroscience*. 2020. Vol. 40, № 36. P. 6842–6853.
 30. Alcohol impairs hippocampal function: from NMDA receptor synaptic transmission to mitochondrial function / R. G. Mira et al. *Drug and Alcohol Dependence*. 2019. Vol. 205. P. 107628.
 31. Alcohol use disorders / A. F. Carvalho et al. *The Lancet*. 2019. Vol. 394, № 10200. P. 781–792.
 32. Alcohol withdrawal syndrome in neurocritical care unit: assessment and treatment challenges / S. Farrokh et al. *Neurocritical care*. 2021. Vol. 34, № 2. P. 593–607.
 33. Alcohol withdrawal syndrome management: Is there anything new? / G. Airagnes et al. *La revue de médecine interne*. 2019. Vol. 40, № 6. P. 373–379.
 34. Algorithm analysis of the DSM-5 alcohol withdrawal symptom / C. S. Martin et al. *Alcoholism: clinical and experimental research*. 2018. Vol. 42, № 6. P. 1073–1083.
 35. Ali M., Moheman A., El-Desoky G. E. Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: review of the current state. *Open Chemistry*. 2012. Vol. 10, № 3. P. 731–750.

36. Alpha-ketoglutarate reduces ethanol toxicity in *Drosophila melanogaster* by enhancing alcohol dehydrogenase activity and antioxidant capacity / M. M. Bayliak et al. *Alcohol*. 2016. Vol. 55. P. 23–33.
37. Alteration of glutamate/GABA balance during acute alcohol intoxication in rats: effect of Xingnaojing injection / J. Wei et al. *Journal of ethnopharmacology*. 2015. Vol. 166. P. 333–339.
38. Amato L., Minozzi S., Davoli M. Efficacy and safety of pharmacological interventions for the treatment of the Alcohol Withdrawal Syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011. Iss. 6 : CD008537. DOI: 10.1002/14651858.CD008537.pub2
39. Analytical Method Volume Intensity (AMVI): A green chemistry metric for HPLC methodology in the pharmaceutical industry / R. Hartman et al. *Green Chemistry*. 2011. Vol.13, Iss. 4. P. 934–939.
40. Animal models of alcoholic liver disease: pathogenesis and clinical relevance / B. Gao et al. *Gene expression*. 2017. Vol. 17, № 3. P. 173–186.
41. Attilia F. et al. Alcohol withdrawal syndrome: diagnostic and therapeutic methods. *Rivista di psichiatria*. 2018. Vol. 53, № 3. P. 118–122.
42. Baclofen decreases compulsive alcohol drinking in rats characterized by reduced levels of GAT-3 in the central amygdala / L. Marti-Prats et al. *Addiction biology*. 2021. Vol. 26, № 4. P. e13011.
43. Becker J., Danovitch I. Functional assessment and treatment of alcohol use disorders. *The assessment and treatment of addiction*. 2019. P. 219–232.
44. Brain glutamate, GABA, and glutamine levels and associations with recent drinking in treatment-naïve individuals with alcohol use disorder versus light drinkers / J. J. Prisciandaro et al. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2019. Vol. 43, № 2. P. 221–226.
45. Brain-derived neurotrophic factor and glutathione peroxidase as state biomarkers in alcohol use disorder patients undergoing detoxification / S. Y. Wu et al. *Medicine*. 2020. Vol. 9, № 17. P. e19938.

46. Caputo C., Wood E., Jabbour L. Impact of fetal alcohol exposure on body systems: a systematic review. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. 2016. Vol. 108, № 2. P. 174–180.
47. Cardioprotective effects of a new glutamic acid derivative in chronic alcohol intoxication / V. N. Perfilova et al. *Alcohol*. 2021. Vol. 93. P. 1–10.
48. Carnitine in alcohol use disorders: a scoping review / A. B. Bota et al. *Alcoholism: clinical and experimental research*. 2021. Vol. 45, № 4. P. 666–674.
49. Cederbaum A. I. Role of Cytochrome P450 and oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Reactive Oxygen Species*. 2017. Vol. 4, № 11. P. 303–319.
50. Cederbaum A. I., Yongke L. Defeng W. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*. 2009. Vol. 83, № 6. P. 519–548.
51. Chavan S. S., Birajdar S. V., Pawar N. R. Clinical profile of patients with alcohol use disorder. *International archives of integrated medicine*. 2018. Vol. 5, № 2. P. 48–56.
52. Chourpiliadis C., Mohiuddin S.S. Biochemistry, Gluconeogenesis. *StatPearls [Internet]*. 2022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544346>
53. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function / V. N. Marty et al. *Neuropharmacology*. 2020. Vol. 167. P. 107991.
54. Cooper R. Diagnosing the diagnostic and statistical manual of mental disorders. London : Routledge, 2018. 96 p.
55. Correlations between subunits of GABAA and NMDA receptors after chronic alcohol treatment or withdrawal, and the effect of taurine in the hippocampus of rats / A.W. Hansen et al. *Alcohol*. 2020. Vol. 82. P. 63–70.
56. Cortical glutamate and GABA changes during early abstinence in alcohol dependence and their associations with benzodiazepine medication / G. Wang et al. *Frontiers in psychiatry*. 2021. Vol. 12. P. 1–7.
57. Curyło J., Wardencki W., Namieśnik J. Green aspects of sample preparation – a need for solvent reduction. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2007. Vol. 16 № 1. P. 5–16.

58. Day E., Daly C. Clinical management of the alcohol withdrawal syndrome. *Addiction*. 2021. Vol. 117, Iss. 3. P. 804–814.
59. Defeng W., Cederbaum A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*. 2003. Vol. 27, № 4. P. 277–284.
60. Diagnosis and treatment of acute alcohol intoxication and alcohol withdrawal syndrome: position paper of the Italian society on alcohol / Caputo F. et al. *Internal and emergency medicine*. 2019. Vol. 14, № 1. P. 143–160.
61. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. *The American Psychiatric Association*, ed. 5. Washington: DC. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
62. Dietary fatty acids and bioactive fatty acid metabolites in alcoholic liver disease / K. H. Zirnheld et al. *Liver Research*. 2019. Vol. 3, Iss. 3–4. P. 206–217.
63. Dietary fiber deficiency as a component of malnutrition associated with psychological alterations in alcohol use disorder / C. Amadiou et al. *Clinical Nutrition*. 2021. Vol. 40, № 5. P. 2673–2682.
64. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010. L 276. P. 33–79.
65. Doctor N., Yang Y. Separation and analysis of aspirin and metformin hcl using green subcritical water chromatography. *Molecule*. 2018. Vol. 23, № 9. P. 1–9.
66. Dunn W., Shah V. H. Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Clinics in liver disease*. 2016. Vol. 20, № 3. P. 445–456.
67. Effects of gabapentin on dorsal anterior cingulate cortex GABA and glutamate levels and their associations with abstinence in alcohol use disorder: a randomized clinical trial / J. J. Prisciandaro et al. *American Journal of Psychiatry*. 2021. Vol. 178, № 9. P. 829–837.
68. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959. Vol. 82. P. 70–77.
69. Epidemiology of alcohol-associated liver disease / S. Han et al. *Clinics in Liver Disease*. 2021. Vol. 25, № 3. P. 483–492.

70. Epidemiology of DSM-5 alcohol use disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III / B. F. Grant et al. *JAMA Psychiatry*. 2015. Vol. 72, № 8. P. 757–766.
71. European Association for the study of the liver. *EASL clinical practice guidelines: management of alcohol-related liver disease* / J Hepatol. 2018. Vol. 69, № 1. P. 154–181.
72. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. 2019.
73. Evaluation of oxidative stress biomarkers and liver and renal functional parameters in patients during treatment a mental health unit to treat alcohol dependence / S. S. Dries et al. *Drug and chemical toxicology*. 2022. Vol. 45, № 2. P. 861–867.
74. Ezequiel L. L., Nobre M. J. The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*. 2012. Vol. 213. P. 93–105.
75. Glutamate contributes to alcohol hepatotoxicity by enhancing oxidative stress in mitochondria / V. V. Teplova et al. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2017. Vol. 49, № 3. P. 253–264.
76. Glutamate transmission to ventral tegmental area GABA neurons is altered by acute and chronic ethanol / S. B. Williams et al. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2018. Vol. 42, № 11. P. 2186–2195.
77. Glutathione and transsulfuration in alcohol-associated tissue injury and carcinogenesis / Y. Chen et al. *Alcohol and cancer*. 2018. Vol. 1032. P. 37–53.
78. Goh E.T., Stokes C.S., Sidhu S.S., Vilstrup H., Gluud L.L., Morgan M.Y. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018. Iss. 15. № 5:CD012410. DOI: 10.1002/14651858.CD012410.pub2
79. Green and sustainable solvents in chemical processes / C. J. Clarke, W. C. Tu, O. Levers et al. *Chemical Reviews*. 2018. Vol. 118, № 2. P. 747–800.
80. Green solvents in thin-layer chromatography / A. Mohammad et al. *Green Solvents I*. 2012. P. 331–361.

81. Hausladen A., Ruth G. A. Glutathione. Antioxidants in higher plants. *CRC Press*. 2017. P. 1–30.
82. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development Step 5. *European Medicines Agency*. 2017. 24 p.
83. ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Step 5. Note for guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (CPMP/ICH/365/96). *European Medicines Agenc*. 2006. 17 p.
84. Impact of Maltitol and Sorbitol on Technological and Sensory Attributes of Biscuits / M. Roze, D. Crucean, G. Diler et al. *Foods*. 2021. Vol. 10. P. 2545. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112545>
85. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research / C. Kilkenny et al. *PLoS Biol*. 2010. Vol. 8, № 6 : e1000412.
86. Interventions for treatment and/or prevention of alcohol hangover: Systematic review / R. Jayawardena et al. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2017. Vol. 32, Iss. 5 : e2600. DOI: 10.1002/hup.2600.
87. Intraindividual changes in brain GABA, glutamate, and glutamine during monitored abstinence from alcohol in treatment-naïve individuals with alcohol use disorder / J. Prisciandaro et al. *Addiction Biology*. 2020. Vol. 25, № 6. P. e12810.
88. Jayawardena R., Thejani T., Ranasinghe P., Fernando D., Verster J. C. Intervention for treatment of alcohol hangover: systematic review. *Hum Psychopharmacol*. 2017. Vol. 32, № 5. P. 1–8.
89. Jewett B. E., Sharma S. Physiology, GABA. StatPearls [Internet]. 2018. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513311/>
90. Johnson A. L., Hayward K. L. Managing medicines in alcohol-associated liver disease: a practical review. *Australian Prescriber*. 2021. Vol. 44, № 3. P. 96–106.
91. Ju C., Colgan S. P., Eltzschig H. K. Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases. *Journal of molecular medicine*. 2016. Vol. 94, № 6. P. 613–627.
92. Kaur H., Singla G., Singla B. Comparison of homocysteine levels in various liver diseases. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 2019. Vol. 13, № 11. P. 1–3.

93. Korsakoff syndrome: an overlook / I. Popa et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2021. Vol. 22, № 4. P. 1132.
94. Kranzler H.R., Soyka M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: a review. *JAMA*. 2018. Vol. 320, № 8. P. 815–824.
95. Kravos M. Glutamate Dehydrogenase Applicability in Clinical Practice. *Medical Research Archives*. 2021. Vol. 9, Iss. 3. P. 1–8.
96. Lackner C., Tiniakos D. Fibrosis and alcohol-related liver disease. *Journal of hepatology*. 2019. Vol. 70, № 2. P. 294–304.
97. Leggio L., Lee M.R. Treatment of alcohol use disorder in patients with alcoholic liver disease. *American Journal of Medicine*. 2017. Vol. 130, № 2. P. 124–134.
98. Lim D. J., Sharma Y., Thompson C. H. Vitamin C and alcohol: a call to action. *BMJ Nutrition, Prevention & Health*. 2018. Vol. 1, № 1. P. 17–22.
99. Linking pathogenic mechanisms of alcoholic liver disease with clinical phenotypes / L. E. Nagy et al. *Gastroenterology*. 2016. Vol. 150, № 8. P. 1756–1768.
100. Lipid metabolism in development and progression of hepatocellular carcinoma / M. Sangineto et al. *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 6. P. 1419.
101. Lipid profile dysregulation predicts alcohol withdrawal symptom severity in individuals with alcohol use disorder / D. B. Rosoff et al. *Alcohol*. 2020. Vol. 86. P. 93–101.
102. Long D., Long B., Koyfman A. The emergency medicine management of severe alcohol withdrawal. *Am J Emerg Med*. 2017. Vol. 35, № 7. P. 1005–1011.
103. Lucas K., Grantner G. R., Street J. Alcohol withdrawal in the inpatient setting. *US Pharm*. 2019. Vol. 44, № 11. P. 8–12.
104. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product / M. Kowalska, M. Woźniak, M. Kijek et al. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12 : 1. DOI: 10.1038/s41598-021-99269
105. Marik P. E., Liggett A. Adding an orange to the banana bag: vitamin C deficiency is common in alcohol use disorders. *Crit Care*. 2019. Vol. 23 : 165. DOI: 10.1186/s13054-019-2435-4

106. McKay J.R., Hiller-Sturmhofel S. Treating alcoholism as a chronic disease: approaches to long-term continuing care. *Alcohol Res Health*. 2011. Vol. 33, № 4. P. 356–370.
107. Mellinger J. L. Epidemiology of alcohol use and alcoholic liver disease. *Clinical liver disease*. 2019. Vol. 13, №. 5. P. 136–139.
108. Metabotropic glutamate receptors in alcohol use disorder: physiology, plasticity, and promising pharmacotherapies / M. E. Joffe et al. *ACS chemical neuroscience*. 2018. Vol. 9, № 9. P. 2188–2204.
109. Minozzi S., Amato L., Vecchi S., Davoli M. Anticonvulsants for alcohol withdrawal. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2010. Iss. 3 : CD005064. DOI: 10.1002/14651858.CD005064.pub3
110. Mora S.I., García-Román J., Gómez-Ñañez I., García-Román R. Chronic liver diseases and the potential use of S-adenosyl-L-methionine as a hepatoprotector. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018. Vol. 30, № 8. P. 893–900.
111. Nair A.B., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016. Vol. 7, № 2. P. 27–31.
112. Newman R. K., Gallagher M. A. S., Gomez A. E. Alcohol Withdrawal. StatPearls [Internet]. 2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441882>
113. Newton D. W. Maillard reactions in pharmaceutical formulations and human health. *Int J Pharm Compd*. 2011. Vol. 15, № 1. P. 32–40.
114. Nutritional care of patients admitted to hospital for alcohol withdrawal: A 5-year retrospective audit / C. McLean et al. *Alcohol and alcoholism*. 2020. Vol. 55, Iss. 5. P. 489–496.
115. Osna N. A., Donohue T. M. Jr., Kharbanda K. K. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. *Alcohol research: current reviews*. 2017. Vol. 38, Iss. 2. P. 147–161.
116. Patel A., Karamchandani K. Alcohol Withdrawal. *50 Landmark papers every intensivist should know* / ed. by S. M. Cohn, A. Lisbon, S. Heard. Boca Raton : CRC Press, 2021. P. 291–296.

117. Patel N. D. Role of oxidative stress and homocysteine. *Journal of Evolutionary Medicine*. 2021. Vol. 9, Iss. 1.
118. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease / Ling-Zu Kong et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 11. P. 2712.
119. Pena-Pereira F., Kloskowskic A., Namieśnikb J. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a novel generation of eco-friendly alternati. *Green Chem*. 2015. Vol. 17. P. 3687–3705.
120. Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE – Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Anal. Chem*. 2020, 92 (14), 10076 – 10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
121. Penning R., McKinney A., Verster J. C. Alcohol Hangover symptoms and their contribution to the overall hangover severity. *Alcohol Alcohol*. 2012. Vol. 47, № 3. P. 248–252.
122. Perioperative management of alcohol withdrawal syndrome / A. L. Ungur et al. *Visceral Medicine*. 2020. Vol. 36, № 3. P. 160–166.
123. Pittler M.H., Verster J.C., Ernst E. Interventions for preventing or treating alcohol hangover: systematic review of randomised controlled trials. *British Medical Journal*. 2005. Vol. 331, № 7531. P. 1515–1518.
124. Potential use of the maillard reaction for pharmaceutical applications: gastric and intestinal controlled release alginate-albumin beads / M. Khoder, H. K. Gbormoi, A. Ryan et al. *Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, № 2. P. 83. DOI: 10.3390/pharmaceutics11020083.
125. Prat D., Hayler J., Wells A. A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry*. 2014. Vol. 16, № 10. P. 4546–4551.
126. Prat G., Adan A., Sanchez-Tuert M. Alcohol hangover: A critical review of explanatory factors. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2009. Vol. 24. P. 259–267.

127. Pregabalin, tiapride and lorazepam in alcohol withdrawal syndrome: a multi-centre, randomized, single-blind comparison trial / G. Martinotti et al. *Addiction*. 2010. Vol. 105, № 2. P. 288–299.
128. Qiu T., Li H., Cao Y. Pre-staining thin layer chromatography method for amino acid detection. *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, № 50. P. 8679–8681.
129. R. Marisa, D. Kirson, S. Khom. The role of the central amygdala in alcohol dependence. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2020. Vol. 11, № 2: a039339.
130. Razvodovsky Y. E. Hangover Syndrome: Pathogenesis and Treatment. *Int Arch Subst Abuse Rehabil*. 2021. Vol. 3, Iss. 1. P. 1–5.
131. Rehm J., Samokhvalov A.V., Shield K.D. Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol*. 2013. Vol. 59, № 1. P. 160–168.
132. Rehm J., Shield K. D. Global burden of alcohol use disorders and alcohol liver disease. *Biomedicines*. 2019. Vol. 7, № 4. P. 99.
133. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. *Thieme*. 2007. DOI: 10.1055/b-002-66241
134. Rossi D. J., Richardson B. D. The cerebellar GABA_AR system as a potential target for treating alcohol use disorder. *Neuropharmacology of Alcohol. Handbook of Experimental Pharmacology*. 2018. Vol. 248. P. 113–156.
135. Royle S., Owen L., Roberts D., Marrow L. Pain Catastrophising Predicts Alcohol Hangover Severity and Symptoms. *Journal of clinical medicine*. 2020. Vol. 9, № 1 : 280. DOI: 10.3390/jcm9010280
136. RP-HPLC×HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry / T. M. Pedroso et al. *Talanta*. 2016. Vol. 160. P. 745–753.
137. Rudakova O. V., Gubar S. M., Bezchasnyuk O. M., Bevz N. Y., Smielova N. M., Georgiyants V. A. Розробка складу та технології комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 1. С. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721>
138. Rudakova O. V., Gubar S. M., Smielova N. M., Kriukova A. I., Bevz N. Y., and Georgiyants V. A. The selection of ‘Green’ conditions for components identification

in a combined medicine by TLC/HPTLC Methods. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 2. P. 52–63. DOI: <http://ophcj.nuph.edu.ua/article/view/259691>

139. Rudakova O., Gubar S., Bezchasnyuk O., Georgiyants V. Justification for choosing a dosage form of a combined original pharmaceutical preparation. *Science and practice 2018: abstracts of 9th International Pharmaceutical Conference, Kaunas, November 09, Lithuania*. 2018. P. 102.
140. Rudakova O., Gubar S., Kriukova A., Smielova N., Yaremenko M. Development and validation of glycine standardization technique in the new combination drug with the antialcohol effect. *Science and practice 2019 : abstracts of 10th International Pharmaceutical Conference, Kaunas, November 15, Lithuania*. 2019. P. 44.
141. Rudakova O., Gubar S., Kriukova A., Smielova N., Bezchasnyuk E. Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. № 5 (21). P. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294>
142. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Lytkin D., Briukhanova T., Bezchasnyuk E., Bevz N., Georgiyants V. Study of compatibility of components of a new combined drug for treatment of alcoholic intoxication and its hepatoprotective effect on a model of alcoholic liver injury. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. Vol. 6, № 34. P. 91–100.
143. Rudakova O., Gubar S., Yaremenko M., Smielova N., Georgiyants V. The development and validation of the assay technique for ascorbic and acetylsalicylic acids in a combination medicinal product by HPLC. *Хімічні Каразінські читання – 2020 : XII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 21 – 23 квіт. 2020 р., Харків, 2020*. С. 23–24.
144. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Yaremenko M., Bevz N., Georgiyants V. Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug

- by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 2 (36). P. 81–89.
DOI: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.25585>
145. Rumgay H., Murphy N., Ferrari P., Soerjomataram I. Alcohol and cancer: epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*. 2021. Vol. 13, № 9. P. 41–53.
 146. Schneider R. Jr, Bandiera S., Souza D.G., Bellaver B., Caletti G., Quincozes-Santos A., Elisabetsky E., Gomez R. N-acetylcysteine Prevents Alcohol Related Neuroinflammation in Rats. *Neurochem Res*. 2017. Vol. 42, № 8. P. 2135–2141.
 147. Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis. / N. V. Leach, E. Dronca, S. C. Vesa et al. *European journal of internal medicine*. 2014. Vol. 25, № 8. P. 762–767.
 148. Skeletal muscle mass index and phase angle are decreased in individuals with dependence on alcohol and other substances / M. P. P. Coelho et al. *Nutrition*. 2020. Vol. 71. P. 110614.
 149. Soyka M., Schmidt P., Franz M., Barth T., De Groot M., Kienast T. Reinert T., Richter C., Sander G. Treatment of alcohol withdrawal syndrome with a combination of tiapride/carbamazepine: results of a pooled analysis in 540 patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006. Vol. 256, № 7. P. 395–401.
 150. Spoelstra-de Man A.M.E., Elbers P.W.G., Oudemans-van Straaten H.M. Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. *Crit Care*. 2018. Vol. 22 : 70. DOI: 10.1186/s13054-018-1996-y
 151. Staudinger H., Krisch K., Leonhäuser S. Role of ascorbic acid in microsomal electron transport and the possible relationship to hydroxylation reactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1961. Vol. 92, № 1. P. 195–207.
 152. Sugimoto K., Takei Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*. 2017. Vol. 47, № 1. P. 70–79.
 153. Sunitha D., Anusri P., Sudhakar M. Wernicke-Korsakoff syndrome: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*. 2019. Vol. 9, № 2. P. 104–108.
 154. Systematic review of nutritional interventions for people admitted to hospital for alcohol withdrawal / C. McLean et al. *Nutrition & Dietetics*. 2020. Vol. 77, Iss. 1. P. 76–89.

155. Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders / P. S. S. Rao et al. *Frontiers in neuroscience*. 2015. Vol. 9. P. 1–11.
156. Teschke R. Alcoholic liver disease: current mechanistic aspects with focus on their clinical relevance. *Biomedicines*. 2019. Vol. 7, № 3. P. 68.
157. Tetsuka S., Hashimoto R. Alcohol-related central nervous system disorders associated with vitamin B deficiency. *SN comprehensive clinical medicine*. 2021. Vol. 3, № 12. P. 528–537.
158. The alcohol hangover research group consensus statement on best practice in alcohol hangover research / J. C. Verster et al. *Curr Drug Abuse Rev*. 2010. Vol. 3, № 2. P. 116–126.
159. The methyl donor S-adenosylmethionine prevents liver hypoxia and dysregulation of mitochondrial bioenergetic function in a rat model of alcohol-induced fatty liver disease / A. L. King et al. *Redox biology*. 2016. Vol. 9. P. 188–197.
160. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health / H. Škovierová, E. Vidomanová, S. Mahmood et al. *International journal of molecular sciences*. 2016. Vol. 17, № 10. P. 1733.
161. Thin-layer chromatography of amino acids: a review / S. A. Bhawani. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2012. Vol. 35, № 11. P. 1497–1516.
162. Tobiszewski M., Namieśnik J. Greener organic solvents in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2017. Vol. 5. P. 1–4.
163. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides / F. P. Byrne, S. Jin, G. Paggiola et al. *Sustainable Chemical Processes*. 2016. Vol. 4, № 7. P. 1–24.
164. Tsai G., Coyle J. T. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annual review of medicine*. 1998. Vol. 49, № 1. P. 173–184.
165. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. *2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans*. 2015. Ed. 8. P.144.
166. Verster J.C., Penning R. Treatment and prevention of alcohol hangover. *Curr Drug Abuse Rev*. 2010. Vol. 3, № 2. P. 103–109.

167. Wernicke-Korsakoff syndrome complicated by subacute beriberi neuropathy in an alcoholic patient / S. Di Marco et al. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2018. Vol. 164. P. 1–4.
168. WHO. *Global status report on alcohol and health 2014*. World Health Organization, Geneva, 2014. P. 392.
169. WHO. *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization, Geneva, 2018. P. 472.
170. Wilson D. F., Matschinsky F. M. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Medical hypotheses*. 2020. Vol. 140. P. 109638.
171. Wit de M., Jones D.G., Sessler C.N., Zilberberg M.D., Weaver M.F. Alcohol-use disorders in the critically ill patient. *Chest*. 2010. Vol. 138, № 4. P. 994–1003.
172. Xiang J., Liu F., Wang B., Chen L., Liu W., Tan S. A literature review on maillard reaction based on milk proteins and carbohydrates in food and pharmaceutical products: advantages, disadvantages, and avoidance strategies. *Foods*. 2021. Vol. 10, № 9. P. 1998. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10091998>
173. Yunjeong K., Min-Gul K. HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma. *Transl Clin Pharmacol*. 2016. Vol. 24, № 1. P. 37–42.
174. Zakrzewski R., Ciesielski W., Kazmierczak D. Application of the iodine–azide procedure for the detection of glycine, alanine, and aspartic acid in planar chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2002. Vol. 25, Iss. 10-11. P. 1599–1614.

ДОДАТКИ

Додаток А

Таблиця А.1

Лікарські засоби, які призначені для лікування алкоголізму та усунення алкогольної інтоксикації, що представлені на фармацевтичному ринку України

№ з/п	Назва лікарського засобу	Лікарська форма	Склад	Виробник
N07B В Засоби для застосування при алкогольній залежності				
1	АЛКОДЕЗ® IC	таблетки	1 таблетка містить метадоксину 0,5 г	ТДВ "ІНТЕРХІМ", Україна
2	ЛІВЕРІА® IC	таблетки	1 таблетка містить метадоксину 0,5 г	ТДВ "ІНТЕРХІМ", Україна
3	ЕСПЕРАЛЬ®	таблетки	1 таблетка містить дисульфіраму 500 мг <i>допоміжні речовини:</i> повідон експіцієнт К30, карбоксиметилцелюлоза натрієва, магнію стеарат, целюлоза мікрокристалічна	Софаримекс - Індустрія Кіміка е Фармaceutіка, С.А., Португалія
4	ТЕТУРАМ	таблетки	1 таблетка містить дисульфіраму (у перерахунку на 100 % і суху речовину) – 150 мг	Публічне акціонерне товариство "Науково-виробничий центр "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Україна
5	МІДЗО®	Краплі для орального застосування	1 мл крапель містить активної речовини ціанаміду 60 мг	СПЕШІАЛ ПРОДАКТС ЛАЙН С.П.А., Італія
6	МЕДИХРОНАЛ®-ДАРНИЦЯ	гранули	пакет № 1: 1 пакет містить: глюкози моногідрату 17,5 г; пакет № 2: 1 пакет містить: гліцину 7 г; натрію форміату 3,5 г	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна
N07X X Інші засоби, що діють на нервову систему				
7	АРМАДИН®	Таблетки, вкриті оболонкою	таблетка містить армадіну (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату) 125 мг	ТОВ НВФ "МІКРОХІМ", Україна
8	АРМАДИН® ЛОНГ	таблетки пролонгованої дії	1 таблетка містить армадіну (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату) 500 мг	ТОВ НВФ "МІКРОХІМ", Україна
9	АРМАДИН® ЛОНГ	таблетки пролонгованої дії	1 таблетка містить армадіну (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату) 300 мг	ТОВ НВФ "МІКРОХІМ", Україна

Продовження таблиці А.1

№ з/п	Назва лікарського засобу	Лікарська форма	Склад	Виробник
10	ЕЛФУНАТ	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	К.О. Ромфарм Компані С.Р.Л., Румунія
11	ЕЛФУНАТ	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	Мефар Ілач Сан. А.Ш., Туреччина
12	АМБРІЯ	Розчин для ін'єкцій	1 ампула містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 100,0 мг	К.Т. РОМФАРМ КОМПАНІ С.Р.Л., Румунія
13	ПЕРВАГОР	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинат у перерахуванні на 100 % речовину 50 мг	Приватне акціонерне товариство "Лекхім-Харків", Україна
14	АЛАКОР	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинат у перерахуванні на 100 % речовину – 50 мг	Приватне акціонерне товариство "Лекхім-Харків", Україна
15	МЕКСИКОР®	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату – 50 мг	ПрАТ "Лекхім-Харків", Україна
16	ЛОДИКСЕМ	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50,0 мг	ТОВ "Юрія-Фарм", Україна
17	МЕКСИПРИМ®	Розчин для ін'єкцій	1 мл препарату містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	К.Т. РОМФАРМ КОМПАНІ С.Р.Л., Румунія
18	ТІАМЕКС	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	Приватне акціонерне товариство "Лекхім-Харків", Україна
19	НІКОМЕКС	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	ПрАТ "Лекхім-Харків", Україна
20	ДІНАР	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату (у перерахуванні на 100 % суху речовину) – 50 мг	ТОВ НВФ "Мікрохім", Україна
21	ЗАМЕКСЕН	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	Приватне акціонерне товариство "Лекхім - Харків", Україна
22	ВЕНОКОР	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	Приватне акціонерне товариство "Лекхім - Харків", Україна

Продовження таблиці А.2

№ з/п	Назва лікарського засобу	Лікарська форма	Склад	Виробник
23	МЕКС-ЗДОРОВ'Я	Розчин для ін'єкцій	1 мл препарату містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50,0 мг	Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
24	НЕЙРОТОП ФЛ	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить етилметилгідроксипіридину сукцинату 50 мг	ЗАТ "Ліквор", Республіка Вірменія
25	ГЛІЦИСЕД	таблетки	1 таблетка містить гліцину у перерахуванні на 100 % речовину 100 мг	ПАТ "Київмедпрепарат", Україна
26	ГЛІЦИН	таблетки сублінгвальні	1 таблетка сублінгвальна містить гліцину 100 мг	ТОВ "Арпімед", Республіка Вірменія
27	Гліцин	таблетки сублінгвальні	1 таблетка сублінгвальна містить гліцину 100 мг	ПАТ "Хімфармзавод "Червона зірка", Україна
28	Гліцин-Здоров'я	таблетки сублінгвальні	1 таблетка сублінгвальна містить гліцину 100 мг	Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
29	Гліцин-Дарниця	таблетки сублінгвальні	1 таблетка сублінгвальна містить гліцину 100 мг	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна
30	Медихронал®-Дарниця	гранули	пакет № 1: 1 пакет містить: глюкози моногідрату 17,5 г; пакет № 2: 1 пакет містить: гліцину 7 г; натрію форміату 3,5 г	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна
31	Глутамінова кислота	таблетки	1 таблетка містить L-глутамінової кислоти 250 мг	АТ "Київський вітамінний завод", Україна
Гомеопатичні препарати				
32	ПРОПРОТЕН-100	таблетки	1 таблетка містить антитіла до мозкоспецифічного білка S-100 афінно очищені С1000 – 3 мг	ЗАТ Сантоніка, Литва

Продовження таблиці А.1

№ з/п	Назва лікарського засобу	Лікарська форма	Склад	Виробник
33	ЦЕРЕБРУМ КОМПОЗИТУМ Н	Розчин для ін'єкцій	2,2 мл розчину містять: Acidum phosphoricum D10 - 22 мг, Aconitum napellus D6 - 22 мг, Aesculus hippocastanum D4 - 22 мг, Ambra grisea D10 - 22 мг, Anamirta cocculus D4 - 22 мг, Arnica montana D28 - 22 мг, Bothrops lanceolatus D10 - 22 мг, Cerebrum suis D8 - 22 мг, Cinchona pubescens D4 - 22 мг, Conium maculatum D4 - 22 мг, Embryo totalis suis D10 - 22 мг, Gelsemium sempervirens D4 - 22 мг, Hepar suis D10 - 22 мг, Hyoscyamus niger D6 - 22 мг, Kalium bichromicum D8 - 22 мг, Kalium phosphoricum D6 - 22 мг, Magnesium phosphoricum D10 - 22 мг, Manganum phosphoricum D8 - 22 мг, Medorrhinum Nosode D13 - 22 мг, Placenta totalis suis D10 - 22 мг, Ruta graveolens D4 - 22 мг, Selenium D10 - 22 мг, Semecarpus anacardium D6 - 22 мг, Strychnos ignatii D8 - 22 мг, Sulfur D10 - 22 мг, Thuja occidentalis D6 - 22 мг	Біологіше Хайльміттель Хеель ГмбХ, Німеччина
А05В А Препарати, що застосовуються у разі захворювань печінки, ліпотропні речовини				
34	АРГІТЕК	Розчин для інфузій	1 мл розчину містить аргініну глутамату 8 мг	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна
35	АРГІНІН - ДАРНИЦЯ	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить аргініну глутамату 40 мг	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна
36	ГЛУТАРГІН	таблетки	1 таблетка містить аргініну глутамату 750 мг (0,75 г)	ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
37	ГЛУТАРГІН	таблетки	1 таблетка містить аргініну глутамату 250 мг (0,25 г)	ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
38	ГЛУТАРГІН	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить аргініну глутамату 40 мг	ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна

Продовження таблиці А.1

№ з/п	Назва лікарського засобу	Лікарська форма	Склад	Виробник
39	ГЛУТАРГІН	Розчин для ін'єкцій	1 мл розчину містить аргініну глутамату 200 мг	ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
40	ГЛУТАРГІН	Концентрат для розчину для інфузій	1 мл препарату містить аргініну глутамату 400 мг	ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
41	Глутаргін алкоклін	порошок для орального розчину	1 пакет (3 г) містить аргініну глутамату 1 г; <i>допоміжні речовини:</i> гліцин, маніт (Е 421), кислота лимонна безводна, аспартам (Е 951); ароматизатор «Лимон», що містить мальтодекстрин, гуміарабік, кислоту лимонну	ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна
42	Глутаргін алкоклін	таблетки	1 таблетка містить аргініну глутамату 1 г; <i>допоміжні речовини:</i> целюлоза мікрокристалічна, кросповідон, кальцію стеарат	ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна
N02 BA51 Анальгетики. Інші анальгетики та антипіретики. Саліцилова кислота та її похідні.				
43	АСПІРИН® С	Таблетки шипучі	1 таблетка містить 400 мг ацетилсаліцилової кислоти та 240 мг аскорбінової кислоти (вітаміну С)	Байер Біттерфельд ГмбХ, Німеччина
A07B Ентеросорбенти				
44	Вугілля активоване	таблетки	1 таблетка містить: вугілля активоване – 0,25 г	ПАТ "Хімфармзавод "Червона зірка", Україна
45	Біле вугілля	таблетки	1 таблетка містить кремнію діоксиду колоїдного безводного 210 мг (у перерахунку на 100 % суху речовину)	ТОВ "ФАРМЕКС ГРУП", Україна
46	СОРБЕНТОГЕЛЬ	Гель оральний	1 г препарату містить: гідрогелю метилкремнієвої кислоти 0,7 г	Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична фірма "Вертекс", Україна

Таблиця А.2

Дієтичні добавки, які призначені для лікування алкоголізму та усунення алкогольної інтоксикації, що представлені на фармацевтичному ринку України

№ з/п	Назва/ лікарська форма	Діюча речовина	Фармакологічні властивості	Показання до застосування	Виробник/ Країна
14.1. Дієтичні добавки — сорбенти					
1	АПСОРБІН пор. для оральної суспензії 3 г саше №10, №30	Діосмектит	Абсорбційна, детоксуюча дії	Для корекції раціонів дієтичного харчування з метою з меншення всмоктування алкоголю та для прискорення виведення його з організму	АТ «Фармак», Україна
2	БІЛЕ ВУГІЛЛЯ ДОБРИЙ РАНОК таб. швидкорозчинні контейнер №6	Діоксид кремнію Бурштинова кислота Таурин	Детоксикаційна, антиоксидантна дії	Профілактика сп'яніння; зниження проявів алкогольної інтоксикації	ТОВ «Омніфарма Київ», Україна
3	МУЛЬТИСОРБ порошок 3 г пакетик № 20	Комплекс біополімерів (целюлоза, геміцелюлоза, лігнін, пектин)		Комплексна дезінтоксикаційна терапія алкогольної інтоксикації	ТОВ «Аріадна», Україна
14.2. Дієтичні добавки, що сприяють детоксикації організму					
4	АЛКО-ВЕРТ капс. №8	Гліцин Аскорбінова кислота Бурштинова кислота Аргініну глутамат Полівінілпіролідон низькомолекулярний медичний	Детоксикаційна дія	Алкогольна інтоксикація	Дослідний завод ДНЦЛЗ, Україна

Продовження таблиці А.2

№ з/п	Назва/ лікарська форма	Діюча речовина	Фармакологічні властивості	Показання до застосування	Виробник/ Країна
5	АЛКО-ГОН таб. № 120	Гліцин Діоксид кремнію Глютамин Бурштинова кислота М'ята перцева Магній	Детоксикаційна, антигіпоксична, антиоксидантна дії; скорочує час абстинентного синдрому	Алкогольна інтоксикація; абстинентний синдром; комплексна терапія хронічного алкоголізму, хвороб печінки, особливо алкогольної етіології	ТОВ Фармаком, Україна
6	АЛКО-СОРБ порошок пакет-саше № 1, № 4, № 12	Діоксид кремнію Бурштинова кислота Таурин	Детоксикаційна, антиоксидантна дії	Для попередження та усунення симптомів похмілля і алкогольної інтоксикації	Орісіл-Фарм, Україна
7	АНТИПОХМЕЛІН капс. № 10	Аскорбінова кислота Амінооцтова кислота Глюкоза Бурштинова кислота Таурин	Знижує токсичну дію алкоголю	Для попередження та усунення симптомів похмілля	Євро Плюс, Україна
8	ДЕТОКС ПЛЮС таб.	Гліцин Аскорбінова кислота Глюкорат кальцію N-ацетилцистеїн Таурин Екстракт броколі Триметилгліцин Лист розмарину Плоди гранатника L-глютамин L-метіонін цинк Глютатион Мідь Фолієва кислота Ціанокобаламін			New Spirit Naturals Inc., США

Продовження таблиці А.2

№ з/п	Назва/ лікарська форма	Діюча речовина	Фармакологічні властивості	Показання до застосування	Виробник/ Країна
9	ПАРИ-ЭВАЛАР таб. № 100	Гліцин Аскорбінова кислота Трава чебрецю Кореневища і корені оману Кореневища з корінням левзеї Трава звіробою Трава деревію Трава хвоща польового Насіння льону Листя сени Трава полину Трава золототисячника	Антидепресивна, вегетостабілізуюча, седативнадії. Нормалізує прцеси обміну.	Лікування і вторинна профілактика алкоголізму; похмільного синдрому	Евалар, Росія
7.2. Дієтичні добавки, що містять ефірні олії					
10	ПЕТРУША капсули № 3, 10, 36	Насіння петрушки Токоферолу ацетат Олія соняшникова	Не зазначено	Засіб освіжаючий для усунення неприємного запаху алкоголю з рота	Київський вітамінний завод, Україна

Специфікація на порошок шипучий для приготування орального розчину

Найменування показника	Допускні межі	Методи контролю
Опис	Вміст пакета № 1 та пакета № 2 – порошок білого або майже білого кольору з характерним запахом.	За п. 1 Візуально, ДФУ*, ст. «Порошки для орального застосування»
Ідентифікація <i>Ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота</i>	На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у розділі «Кількісне визначення. Ацетилсаліцилова кислота та аскорбінова кислота», часи утримування піків ацетилсаліцилової кислоти й аскорбінової кислоти мають збігатися з часами утримування піків ацетилсаліцилової кислоти й аскорбінової кислоти на хроматограмі розчину порівняння з точністю $\pm 2\%$.	За п. 2.1. ДФУ*, 2.2.29 Метод рідинної хроматографії
<i>Глутамінова кислота, гліцин, аскорбінова кислота</i>	На хроматограмі випробовуваного розчину (а), одержаній у розділі «Речовини, що виявляються нінгідрином», мають проявлятися дві хроматографічні зони глутамінової та аскорбінової кислот на рівні хроматографічних зон на хроматограмах розчинів порівняння (а, с), відповідні їм за розміром і забарвленням. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у розділі «Речовини, що виявляються нінгідрином», має проявлятися хроматографічна зона гліцину на рівні хроматографічної зони розчину порівняння (b), відповідна їй за розміром і забарвленням.	За п. 2.2. ДФУ*, 2.2.27 Метод тонкошарової хроматографії, метод вискоефективної тонкошарової хроматографії

Продовження таблиці А.3

Найменування показника	Допускні межі	Методи контролю
<i>Ацетилсаліцилова кислота</i>	Лікарський засіб дає характерну реакцію (а) на саліцилати.	За п. 2.3. ДФУ*, 2.3.1
<i>Аскорбінова кислота</i>	Лікарський засіб дає характерну реакцію на аскорбінову кислоту.	За п. 2.4.
<i>Сорбіт</i>	На хроматограмі випробовуваних розчинів (а, b) мають проявитися хроматографічні зони на рівні зони сорбіту на хроматограмі розчину порівняння.	За п. 2.5. ДФУ*, 2.2.27 Метод тонкошарової хроматографії
<u>Однорідність маси, середня маса вмісту саше-пакеті</u>	Із 20 випробовуваних пакетів допускається не більше 2 пакетів, вміст яких має відхилення від середньої маси вмісту пакета більше $\pm 7,5 \%$, не має бути жодного пакета, вміст якого має відхилення від середньої маси вмісту пакета більше $\pm 15 \%$. Пакет № 1 та пакет № 2: $4,000 \text{ г} \pm 5,0 \%$ Від 3,800 г до 4,200 г	За п. 3 ДФУ*, 2.9.5 ст. «Порошки для орального застосування»
<u>Однорідність дозованих одиниць</u> <i>Ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота</i>	Має відповідати вимогам ДФУ*, 2.9.40 Приймальне число $AV \leq 15$	За п. 4.1 – 4.2. ДФУ*, 2.9.5, 2.9.40, <i>метод прямого визначення,</i> ДФУ*, 2.2.29 Метод рідинної хроматографії
<i>Глутамінова кислота, гліцин</i>	Має відповідати вимогам ДФУ*, 2.9.40 Приймальне число $AV \leq 15$	За п. 4.3 - 4.4. ДФУ*, 2.9.40 <i>метод прямого визначення,</i> 2.2.25 Метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях
<u>Втрата в масі при висушуванні</u>	Не більше 3,0 % для пакета № 1 Не більше 1,5 % для пакета № 2	За п. 5 ДФУ*, 2.2.32 (метод с)

Продовження таблиці А.3

Найменування показника	Допускні межі	Методи контролю
<u>Супровідні домішки</u> <i>Саліцилова кислота</i> <i>Речовини, що виявляються нінгідринном</i>	На хроматограмі випробовуваного розчину площа піку саліцилової кислоти не має перевищувати 0,5 площі основного піку на хроматограмі розчину порівняння (b) (0,50 %). На хроматограмах випробовуваних розчинів (a, b) будь-яка хроматографічна зона, крім основної, не має бути інтенсивнішою за зони на хроматограмах розчинів порівняння (e, f) (0,5 %).	За п. 6.1 ДФУ*, 2.2.29 Метод рідинної хроматографії За п. 6.2 ДФУ*, 2.2.27 Метод тонкошарової хроматографії
<u>Мікробіологічна чистота</u>	Загальна кількість аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – 10^3 КУО/г. Загальна кількість дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – 10^2 КУО/г. <i>Escherichia coli</i>: відсутність в 1 г.	За п. 7 ДФУ*, 2.6.12; 2.6.13; 5.1.4
<u>Кількісне визначення</u>	Вміст в одному пакеті:	
<i>Ацетилсаліцилова кислота</i>	Від 308,75 мг до 341,25 мг (пакет № 1)	За п. 8.1. ДФУ*, 2.2.29 Метод рідинної хроматографії
<i>Аскорбінова кислота</i>	Від 95,0 мг до 105,0 мг (пакет № 1)	
<i>Глутамінова кислота</i>	Від 475,0 мг до 525,0 мг (пакет № 1)	За п. 8.2. ДФУ*, 2.2.29 Метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях

Продовження таблиці А.3

Найменування показника	Допускні межі	Методи контролю
<i>Гліцин</i>	Від 285,0 мг до 315,0 мг (пакет № 2)	За п. 8.3. ДФУ*, 2.2.29 Метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях

* – Державна фармакопея України чинного видання

Таблиця А.4

**Результати вивчення стабільності порошку шипучого для приготування орального розчину в процесі зберігання
за температури (25 ± 2) °С**

Показник якості за проектом МКЯ	Критерії прийнятності	Термін зберігання, міс.						
		Довгострокове зберігання (температура (25±2)°С, відносна вологість (60±5) %)						
		0	3	6	9	12	18	24
Опис	Вміст пакета № 1 та пакета № 2 – порошок білого або майже білого кольору з характерним запахом	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає						
Ідентифікація								
Ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота	На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у розділі «Кількісне визначення. Ацетилсаліцилова кислота та аскорбінова кислота», часи утримування піків ацетилсаліцилової кислоти й аскорбінової кислоти мають збігатися з часами утримування піків ацетилсаліцилової кислоти й аскорбінової кислоти на хроматограмі розчину порівняння з точністю ± 2 %.	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
Глутамінова кислота, гліцин, аскорбінова кислота	На хроматограмі випробовуваного розчину (а), одержаній у розділі «Речовини, що виявляються нінгідринном», мають проявлятися дві хроматографічні зони глутамінової та аскорбінової кислот на рівні хроматографічних зон на хроматограмах розчинів порівняння (а, с), відповідні їм за розміром і забарвленням. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у розділі «Речовини, що виявляються нінгідринном», має проявлятися хроматографічна зона гліцину на рівні хроматографічної зони розчину порівняння (b), відповідна їй за розміром і забарвленням.	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає

Продовження таблиці А.4

Показник якості за проектом МКЯ	Критерії прийнятності	Термін зберігання, міс.						
		Довгострокове зберігання (температура (25±2)°С, відносна вологість (60±5) %)						
		0	3	6	9	12	18	24
<i>Ацетилсаліцилова кислота</i>	Лікарський засіб дає характерну реакцію (а) на саліцилати.	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
<i>Аскорбінова кислота</i>	Лікарський засіб дає характерну реакцію на аскорбінову кислоту.	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
<i>Сорбіт</i>	На хроматограмі випробовуваних розчинів (а, b) мають проявитися хроматографічні зони на рівні зони сорбіту на хроматограмі розчину порівняння.	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
<u>Середня маса вмісту саше-пакету</u>	Пакет № 1 та пакет № 2: 4,000 г ± 5,0 % Від 3,800 г до 4,200 г	Серія 01. 3,9999± 4,0290± Серія 02. 4,0115 4,0001 Серія 03. 3,9819 4,1018	Серія 01. 4,0011± 3,9998± Серія 02. 4,1024 3,9786 Серія 03. 3,9898 3,9913	Серія 01. 3,9898± 4,0110± Серія 02. 4,1876 4,0218 Серія 03. 4,0012 4,0921	Серія 01. 3,9915± 4,0186 Серія 02. 3,9767 4,0911 Серія 03. 3,9888 3,9991	Серія 01. 3,9987 3,9997 Серія 02. 3,9998 4,0118 Серія 03. 4,1217 4,0189	Серія 01. 3,9997 4,0097 Серія 02. 3,9999 4,0290 Серія 03. 3,9765 4,0112	Серія 01. 3,9881 4,0120 Серія 02. 4,0876 4,0293 Серія 03. 3,9999 4,0988

Продовження таблиці А.4

Показник якості за проектом МКЯ	Критерії прийнятності	Термін зберігання, міс.						
		Довгострокове зберігання (температура (25±2)°С, відносна вологість (60±5) %)						
		0	3	6	9	12	18	24
Однорідність маси	Із 20 випробовуваних пакетів допускається не більше 2 пакетів, вміст яких має відхилення від середньої маси вмісту пакета більше $\pm 7,5$ %, не має бути жодного пакета, вміст якого має відхилення від середньої маси вмісту пакета більше ± 15 %.	Серія 01. -3,32% 3,71% Витримує Серія 02. -2,67% 2,00% Витримує Серія 03. -2,56% 2,16% Витримує	Серія 01. -3,12% 2,99% Витримує Серія 02. -3,30% 3,12% Витримує Серія 03. -4,01% 2,87% Витримує	Серія 01. -4,01% 4,12% Витримує Серія 02. -4,01% 3,34% Витримує Серія 03. -3,76% 2,42% Витримує	Серія 01. -2,78% 3,15% Витримує Серія 02. -2,76% 2,18% Витримує Серія 03. -3,11% 3,00% Витримує	Серія 01. -3,15% 2,76% Витримує Серія 02. -3,89% 2,01% Витримує Серія 03. -2,97% 2,55% Витримує	Серія 01. -3,01% 2,65% Витримує Серія 02. -2,99% 2,14% Витримує Серія 03. -2,98% 2,19% Витримує	Серія 01. -2,87% 3,01% Витримує Серія 02. -2,86% 3,19% Витримує Серія 03. -3,01% 2,14% Витримує
Однорідність дозованих одиниць								
<i>Ацетилсаліцилова кислота, аскорбінова кислота</i>	Має відповідати вимогам ДФУ*, 2.9.40 Приймальне число $AV \leq 15$	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
<i>Глутамінова кислота, гліцин</i>	Має відповідати вимогам ДФУ*, 2.9.40 Приймальне число $AV \leq 15$	Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає		Серія 01. Відповідає Серія 02. Відповідає Серія 03. Відповідає
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3,0 % для пакета № 1 Не більше 1,5 % для пакета № 2	Серія 01. 2,21% 0,95% Серія 02. 1,98% 0,99% Серія 03. 2,03% 1,15%	Серія 01. 2,26% 1,00% Серія 02. 2,03% 1,04% Серія 03. 2,06% 1,20%	Серія 01. 2,28% 1,03% Серія 02. 2,08% 1,11% Серія 03. 2,13% 1,25%	Серія 01. 2,34% 1,11% Серія 02. 2,13% 1,14% Серія 03. 2,18% 1,28%	Серія 01. 2,42% 1,15% Серія 02. 2,17% 1,19% Серія 03. 2,23% 1,35%	Серія 01. 2,46% 1,22% Серія 02. 2,23% 1,22% Серія 03. 2,26% 1,41%	Серія 01. 2,59% 1,27% Серія 02. 2,27% 1,31% Серія 03. 2,32% 1,44%

Продовження таблиці А.4

Показник якості за проєктом МКЯ	Критерії прийнятності	Термін зберігання, міс.						
		Довгострокове зберігання (температура (25±2)°С, відносна вологість (60±5) %)						
		0	3	6	9	12	18	24
Супровідні домішки								
Саліцилова кислота	На хроматограмі випробовуваного розчину площа піку саліцилової кислоти не має перевищувати 0,5 площі основного піку на хроматограмі розчину порівняння (b) (0,50 %).	Серія 01. Витримує Серія 02. Витримує Серія 03. Витримує						
Речовини, що виявляються нінгідрином	На хроматограмах випробовуваних розчинів (a, b) будь-яка хроматографічна зона, крім основної, не має бути інтенсивнішою за зони на хроматограмах розчинів порівняння (e, f) (0,5 %).	Серія 01. Витримує Серія 02. Витримує Серія 03. Витримує						
Мікробіологічна чистота	Загальна кількість аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – 10 ³ КУО/г. Загальна кількість дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – 10 ² КУО/г. Escherichia coli: відсутність в 1 г.	Серія 01. Витримує Серія 02. Витримує Серія 03. Витримує						
Кількісне визначення (вміст в одному пакеті):								
Ацетилсаліцилова кислота	Від 308,75 мг до 341,25 мг (пакет № 1)	330,2	327,5	328,4	320,4	317,6	316,2	311,5
Аскорбінова кислота	Від 95,0 мг до 105,0 мг (пакет № 1)	102,9	102,2	102,8	101,5	99,15	98,4	97,5
Глутамінова кислота	Від 475,0 мг до 525,0 мг (пакет № 1)	515,5	514,1	510,2	509,7	502,7	499,7	490,4
Гліцин	Від 285,0 мг до 315,0 мг (пакет № 2)	306,7	304,2	303,1	302,9	302,1	302,1	302,4

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Rudakova O., Gubar S., Kriukova, A., Smielova N., Bezchasnyuk E. Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. № 5 (21). P. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294> (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, у проведенні дослідження, в обробці одержаних даних, написання статті).
2. Rudakova O., Gubar S., Smielova N., Lytkin D., Briukhanova T., Bezchasnyuk E., Bevz N., Georgiyants V. Study of compatibility of components of a new combined drug for treatment of alcoholic intoxication and its hepatoprotective effect on a model of alcoholic liver injury. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 6 (34). P. 91–100. (Scopus) DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.249880> (Особистий внесок: участь в сборі даних, статистичному аналізі, інтерпретації результатів експерименту та підготовці статті).
3. Rudakova O., Gubar, S., Smielova N., Yaremenko M., Bevz N., Georgiyants V. Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 2 (36). P. 81–89. (Scopus). DOI: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.25585> (Особистий внесок: брала участь в сборі даних, аналізі та інтерпретації результатів експерименту та підготовка статті).
4. Rudakova O. V., Gubar S. M., Bezchasnyuk O. M., Bevz N. Y., Smielova N. M., Georgiyants V. A. Розробка складу та технології комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 1. С. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721> (Особистий внесок: участь в обговоренні, узагальненні результатів експерименту та підготовці статті).
5. Rudakova O. V., Gubar S. M., Smielova N. M., Kriukova A. I., Bevz N. Y., and Georgiyants V. A. The selection of ‘Green’ conditions for components identification

in a combined medicine by TLC/HPTLC Methods. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 2. P. 52–63. DOI: <http://ophcj.nuph.edu.ua/article/view/259691> (Особистий внесок: участь в аналізі літературних джерел, проведено частину експериментального дослідження, підготовка статті до публікації).

6. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Рудакова О. В. Визначення стратегії та підходів фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи*: матеріали II Всеукр. наук. конф., м. Житомир, 16 трав. 2018 р. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. І. Франка 2018. С. 223–225.

7. Губарь С. М., Безчаснюк О. М., Смєлова Н. М., Рудакова О. В. Вивчення сумісності компонентів на етапі фармацевтичної розробки лікарського засобу антиалкогольної дії. *Управління якістю в фармації*: матеріали XII наук.-практ. конф., м. Харків, 18 трав. 2018 р. Х. : НФаУ, 2018. С. 50–51.

8. Rudakova O., Gubar S., Bezchasnyuk O., Georgiyants V. Justification for choosing a dosage form of a combined original pharmaceutical preparation. *Science and practice 2018: abstracts of 9th International Pharmaceutical Conference*, Kaunas, November 09, Lithuania. 2018. P. 102.

9. Губарь С. Н., Рудакова О. В., Безчаснюк Е. М., Георгиянц В. А. Обоснование выбора аминокислот и их стандартизация в оригинальном лекарственном средстве антиалкогольного действия. *Роль и место инновационных технологий в современной медицине*: материалы 66-ой годичной науч.-практ. конф. с междунар. уч. ТГМУ им. Абуали ибни Сино, г. Душанбе, 23 нояб. 2018. Т. 2. С. 356–357.

10. Рудакова О. В., Губарь С. М., Крюкова А. І., Смєлова Н. М., Безчаснюк О. М. Обґрунтування вибору тіоктової кислоти та її стандартизація в оригінальному лікарському засобі антиалкогольної дії. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського*: матеріали підсумк. LXII наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 13 черв. 2019. Тернопіль : ТНМУ, 2019. С. 96–97.

11. Rudakova O., Gubar S., Kriukova A., Smielova N., Yaremenko M. Development and validation of glycine standardization technique in the new combination drug with the antialcohol effect. *Science and practice 2019* : abstracts of 10th International Pharmaceutical Conference, Kaunas, November 15, Lithuania. 2019. P. 44.
12. Rudakova O., Gubar S., Yaremenko M., Smielova N., Georgiyants V. The development and validation of the assay technique for ascorbic and acetylsalicylic acids in a combination medicinal product by HPLC. *Хімічні Каразінські читання – 2020* : XII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 21 – 23 квіт. 2020 р., Харків, 2020. С. 23–24.
13. Підбір «зеленої» рухомої фази для ефективного розділення глютамінової кислоти та гліцину у комбінованому лікарському засобі методом ТШХ / О. В. Рудакова, С. М. Губарь, Н. М. Смєлова, Н. Ю. Бєвз, А. І. Крюкова, В. А. Георгіянц. *Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво* : VI Міжнар. наук.-практ. конф., м. Шостка, 23 – 25 лист. 2022 р. м. Суми : Сумський державний університет, 2022. С. 235–239.

Продовж. Додатку Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. II Всеукраїнська наукова конференція «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (м. Житомир, 16 травня 2018 р., форма участі – публікація тез);
2. XII науково-практична конференція «Управління якістю в фармації» (м. Харків, 18 травня 2018 р., форма участі – публікація тез);
3. 9th International Pharmaceutical Conference «Science and practice 2018» (м. Каунас, Литва, 09 листопада 2018 р., форма участі – публікація тез);
4. 66-я годовичная научно-практическая конференция с международным участием ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Роль и место инновационных технологий в современной медицине» (м. Душанбе, 23 листопада 2018 р., форма участі – публікація тез);
5. LXII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського (м. Тернопіль, 13 червня 2019 р., форма участі – публікація тез);
6. 10th International Pharmaceutical Conference «Science and practice 2019» (м. Каунас, Литва, 15 листопада 2019 р., форма участі – публікація тез);
7. XII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2020» (м. Харків, 21 – 23 квітня 2020 р., форма участі – публікація тез);
8. VI Міжнародна науково-практична конференція «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво» (м. Шостка, 23 – 25 листопада 2022 р., форма участі – публікація тез).

Додаток В

Проект

ЗАТВЕРДЖЕНОПроректор з науково-педагогічної роботи НФаУ
проф. Інна ВЛАДИМИРОВА

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет,
м. Харків, Україна

Виробник, країна: Національний фармацевтичний університет,
м. Харків, Україна

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**

**АМІНОАЦЕТАСК
AMINOCETASK**

**порошок шипучий в саше-пакетах (пакет №1 та пакет №2)
для приготування орального розчину**

УПАКОВКА

По 4,0 г у пакети №1 та у пакети №2 з комбінованого матеріалу для фармацевтичних препаратів (буфлену).

По 10 пакетів №1 та 10 пакетів №2, разом з інструкцією для медичного застосування, поміщають в пачку з картону для споживчої тари.

Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 12301-2006.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати в оригінальній упаковці в сухому, захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С. Зберігати у недоступному для дітей місці.

ТЕРМІНИ ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

МАРКУВАННЯ

Графічне оформлення упаковки відповідає наданому оригінал-макету упаковки.

Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії НФаУ
д.фарм.н., професор



В. А. Георгіянти

Аспірант кафедри
фармацевтичної хімії НФаУ



О. В. Рудакова

09 січня 2022р.

Додаток Г

Акти впровадження



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного
університету
проф. Б. О. Туманський

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** методика кількісного визначення гліцину в комбінованому лікарському засобі у формі саше.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, здобувач наукового ступеня доктора філософії Рудакова О.В.
3. **Джерела інформації:** Rudakova, O., Gubar, S., Kriukova, A., Smielova, N., & Bezchasnyuk, E. (2019). Standardization of original medicine anti-alcohol action on assay of glycin. *Sciencerise: pharmaceutical science*, (5 (21), 26–34. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.182294>
Методика спектрофотометричного кількісного визначення гліцину в комбінованому лікарському засобі антиалкогольної дії, яка ґрунтується на реакції утворення забарвлення з нінгідрином за довжині хвилі 568 нм.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.
6. **Результат впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації методів кількісного визначення гліцину в комбінованих лікарських засобах.
7. **Термін впровадження:** Вересень 2021- травень 2022р.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Запорізького державного медичного університету,
доктор фармацевтичних наук, професор

Л. І. Кучеренко

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького
проф. А.Й. Наконечний

„15” вересня 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: Вибір «зелених умов» для визначення компонентів у складі комбінованого препарату для лікування алкогольної інтоксикації методом ТШХ/ВЕТШХ.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, здобувач наукового ступеня доктора філософії Рудакова Ольга Володимирівна.

3. Джерела інформації:

Selection of “green” conditions for identifying components in a combined medicine by TLC/HPTLC methods / O. V. Rudakova, S. M. Gubar, N. M. Smielova, A. I. Kriukova, N. Yu. Bevz, V. A. Georgiyants // Журнал органічної та фармацевтичної хімії 2022, 20 (2). С. 52-63.
<https://doi.org/10.24959/ophcj.22.259691>.

Запропонована методика ідентифікації амінокислот (глутамінової кислоти, гліцину) і аскорбінової кислоти в комбінованому препараті методами тонкошарової хроматографії та високоефективної тонкошарової хроматографії з використанням «зелених умов». Досліджено валідаційні характеристики методу (специфічність, правильність і точність).

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького.

5. Форма впровадження: наукова робота та навчальний процес кафедри.

6. Ефект від впровадження: удосконалення знань студентів та науковців з питань ідентифікації активних фармацевтичних інгредієнтів в комбінованих лікарських засобах методом ТШХ/ВЕТШХ.

7. Термін впровадження: 2022-2023 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького,
докт. фарм. наук, професор

Р. Б. Лесик

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного медичного
університету ім. І.Я. Горбачевського
проф. І. М. Клім

2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: Розробка та валідація методики ідентифікації, кількісного визначення та випробувань на чистоту ацетилсаліцилової і аскорбінової кислоти в сумісній присутності.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, здобувач наукового ступеня доктора філософії Рудакова Ольга Володимирівна.

3. Джерела інформації: Rudakova, O., Gubar, S., Smielova, N., Yaremenko, M., Bevez, N., Georgiyants, V. (2022). Development of a unified approach to the method of identification, quantitative determination of active substances and accompanying impurities in a combined drug by HPLC method. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2 (36), 81–89. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255851>

Запропонований метод рідинної хроматографії для ідентифікації, кількісного визначення ацетилсаліцилової та аскорбінової кислот у сумісній присутності та супутніх домішок у комбінованому препараті у вигляді шипучого порошку для приготування розчину для орального застосування і досліджено валідаційні характеристики.

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського.

5. Форма впровадження: наукова робота та навчальний процес кафедри.

6. Ефект від впровадження: удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки і валідації методів кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в комбінованих лікарських засобах.

7. Термін впровадження: з 2022 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Тернопільського національного медичного
університету ім. І. Я. Горбачевського,
д-р. фарм. наук, професор

Л.С. Логойда

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
ДВНЗ «Ужгородський
національний університет»
проф. Іван ШИРОКОК

„04”

2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: технологія виробництва комбінованого лікарського засобу у формі шипучого порошку для приготування орального розчину.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, здобувач наукового ступеня доктора філософії Рудакова О.В., доцент Бевз Н.Ю., професор Георгіянц В.А.

3. Джерела інформації:

- Рудакова О.В. Розробка складу та технології виробництва комбінованого засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації / О. В. Рудакова, С. М. Губарь, О. М. Безчаснюк, Н. Ю. Бевз, Н. М. Смелова, В. А. Георгіянц *Фармацевтичний часопис*, (1), 39–48. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.1.12721>

Запропоновано розробку складу та технології виробництва комбінованого лікарського засобу для фармакотерапії алкогольної інтоксикації.

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичних дисциплін Ужгородського національного університету.

5. Форма впровадження: наукова робота та навчальний процес кафедри.

6. Ефект від впровадження: удосконалення знань студентів та науковців з питань підходів до технології виробництва шипучого порошку для приготування орального розчину у саше-пакетах, визначення основних стадій та критичних параметрів технологічного процесу.

7. Термін впровадження: з 2022 р.

Завідувач кафедри фармацевтичних дисциплін
ДВНЗ «УжНУ», канд. фарм. наук, доцент



Олег ДЕВІНЯК

Продовження дод. Г

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ»
(УКРПАТЕНТ)

вул. Глазунова, буд. 1, м. Київ, 01601, тел.: (044) 494-05-05, факс: (044) 494-05-06
E-mail: office@ukrpatent.org, сайт: www.ukrpatent.org, код згідно з ЄДРПОУ 31032378

19.01.2022 № 1194/ЗА/22

Стосується заявки № а 2022 00153
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Національний фармацевтичний університет,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002

**Повідомлення
про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)**

(21) Реєстраційний номер заявки а 2022 00153

(71) Заявник(и)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(54) Назва винаходу /корисної моделі/

**КОМБІНОВАНИЙ ЗАСІБ ДЛЯ УСУНЕННЯ СИМПТОМІВ АЛКОГОЛЬНОЇ
ІНТОКСИКАЦІЇ**

Матеріали заявки відповідають вимогам ст. 13 Закону щодо встановлення дати подання заявки на дату одержання Державним підприємством "Український інститут інтелектуальної власності":

- матеріалів заявки

Дата подання заявки

17.01.2022

Провідний експерт

Телефон

494-05-98

Наталія ЗАІКА

