

**ВТОРОЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ
СЪЕЗД**

**"АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ"**

МАТЕРИАЛЫ СЪЕЗДА

Санкт-Петербург - Валаам

29 июня - 2 июля 1998 г.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ОСНОВНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ
МЕТОДОМ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

В.Н. Пак, И.М. Бушуева, Г.И. Барам, Л.А. Кожанова
ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск,
Лимнологический институт СО РАН. г.Иркутск

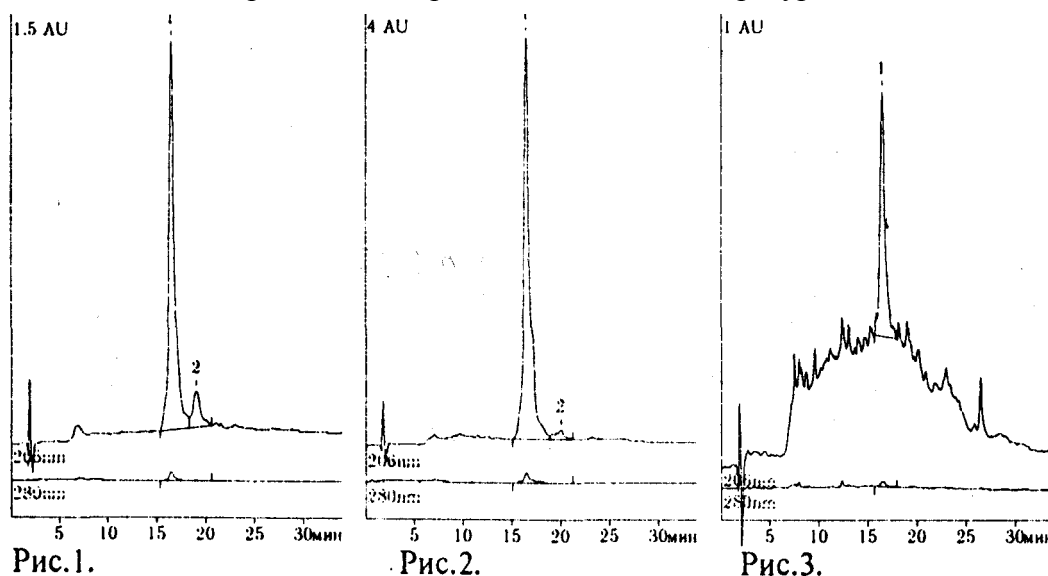
Основной ингибитор протеаз (ОИП) - белок с молекулярной массой 6500 Да выделяется из легких и поджелудочной железы крупного рогатого скота. Он широко применяется для профилактики послеоперационных осложнений органов брюшной полости, в терапии острых и хронических панкреатитов, а также для лечения других заболеваний, сопровождающихся повышением активности протеолитических и фибринолитических ферментов.

Нами была выделена субстанция лекарственного препарата ОИП "Ингитрил" (ВФС 42-708-95). Важнейшим показателем качества данного ингибитора является его чистота и, как следствие, высокая удельная активность, отсутствие побочных реакций организма. В России выпускаются два препарата ОИП - "Ингитрил" и "Ингипрол" (ВФС 42-2176-92). Для определения их активности используются разные методы. Существующий метод контроля качества препарата "Ингитрил" имеет ряд недостатков, главным из которых является использование некалиброванных реактивов трипсина, гемоглобина и альбумина. Для контроля жидкой лекарственной формы ОИП-раствора ("Ингипрол") применяют синтетический субстрат N^α-бензоил-аргинин-4-нитроанилид (БАНИ). В качестве образца

сравнения используют стандартную пробу с известной активностью - раствор Государственного стандартного образца (ГСО). Оба реактива труднодоступны.

Оценку качества ОИП мы проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на микроколоночном жидкостном хроматографе "Миличром А-02" с использованием режима одновременной двухволновой детекции. Для сравнения были использованы также аптечные препараты "Контрикал" (Германия) и "Ингитрил" (г.Омск, Россия). Детектирование осуществляли при длинах волн 206 и 280 нм. В этих условиях хорошо идентифицируется ОИП и другие белковые примеси. Отношение площадей хроматографических пиков для ОИП при 280 и 206 нм (интегральное спектральное отношение) является постоянным и равно 0,024. При 206 нм обнаруживаются также углеводы и по их количеству в препарате можно предположительно судить о его пирогенности. В фармакопейных статьях регламентируется суммарное определение белка методом Лоури. В отличие от ВЭЖХ, этот метод не позволяет разделить белок, ОИП и белковые примеси.

Хроматограммы препаратов представлены на рисунках 1-3 (1 - "Контрикал", 2 -ОИП, 3 - "Ингитрил"). На хроматограммах выявляется присутствие основного пика ингибитора с временем выхода 16,4 мин. В "Контрикале" на его долю приходится 91,0% от суммы площадей всех хроматографических пиков при 206 нм, в препарате ОИП - 96,5%, в "Ингитриле" Омского производства - 31,2%. В последнем присутствуют также посторонние примеси белкового характера (спектральные отношения близки к ОИП). Для "Контрикала" оптическая плотность раствора, рассчитанная по площади пика при 280 нм, хорошо совпадает с литературными данными.



Хроматограммы "Контрикала", препарата ОИП и "Ингитрила". Колонка - Нуклеосил С 18,2*75 мм, 5 мкм. Скорость потока 100 мкл/мин. Градиент 0-50% ацетонитрила в воде, 0,1% трифторуксусной кислоты, за 30 мин, затем 50% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты за 4 мин. Температура 35°С, давление 30 атм. Объем пробы 5 мкл. Пик 1 -апротинин.

На основании полученных результатов можно заключить, что метод микроколоночной жидкостной хроматографии с использованием многоволнового режима детекции позволяет проводить идентификацию препаратов ОИП - по времени выхода и спектральным отношениям, а также количественную оценку, с привлечением литературных данных о коэффициенте экстинкции или с использованием известного стандарта (в данном случае - "Контрикал"). С помощью этого метода можно также выявить наличие и, предположительно, характер примесей. К достоинствам данного метода относятся: хорошая воспроизводимость результатов независимо от оператора (в пределах 5%); наглядность результатов и возможность их хранения в файле; быстрота проведения по сравнению с физико-химическими методами; возможность сопоставления лекарственных препаратов с аналогами, стандартами,

другими сериями; отсутствие зависимости от доступности и качества аналитических реактивов; отсутствие необходимости иметь стандарт в каждой серии анализов, достаточно лишь время от времени проверять постоянство времен удерживания.

В нашей стране хроматографы можно приобрести в Институте хроматографии "ЭкоНова" (Россия, 630117, Новосибирск - 117, а/я, тел., факс (3832)-343321). В дополнение отметим, что по полученным нами количественным данным 10 000 АТрЕ Контрикала = 12 ЕД Ингитрила = 13 300 КиЕ Гордокса = 1,0 мг ОИП. Примененный нами метод анализа предлагается ввести в Фармстатью "Ингитрил".