

## Влияние параметра «скорость введения» при выполнении теста «Аномальная токсичность» на обеспечение качества антибиотика группы цефалоспоринов — цефтриаксона

М. В. ШАРОЙКИНА, М. С. РЯБЦЕВА, Е. Л. КОВАЛЕВА, Н. П. НЕУГОДОВА

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

### Influence of the Parameter «The Rate of Administration» During the Test «Abnormal Toxicity» on Quality Control of Ceftriaxone an Antibiotic of the Cephalosporin Group

M. V. SHAROYKINA, M. S. RYABTSEVA, E. L. KOVALEVA, N. P. NEUGODOVA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Изучено влияние скорости введения при выполнении теста «Аномальная токсичность» на оценку качества антибиотика цефтриаксона в сравнительном экспериментальном исследовании на основе методических подходов ГФ XII и ЕФ. Приведены рекомендации к проведению испытания «Аномальная токсичность» для препаратов цефтриаксона.

*Ключевые слова:* аномальная токсичность, антибиотики, цефтриаксон, примеси.

The influence of the rate of administration was examined during the test «Abnormal toxicity» on the quality control of ceftriaxone in a comparative experimental study on the basis of the methodologies Rus. Ph. XII and Eur. Ph. Recommendations are issued for conducting study entitled «Abnormal toxicity» for the formulations of ceftriaxone.

*Key words:* abnormal toxicity, antibiotics, ceftriaxone, impurities.

### Введение

При оценке качества антибиотиков природного происхождения или полученных полусинтетическим путём важная роль отводится результатам биологического контроля, в частности испытанию на аномальную токсичность, что особенно важно, поскольку на фармацевтический рынок РФ поступают лекарственные средства, как в условиях соблюдения международных стандартов GMP, так и лекарственные средства из стран, в которых предприятия работают по национальным стандартам. Данный тест служит для выявления продуктов разложения или других нежелательных примесей при нарушении процесса производства, транспортировки или хранения [1], и, таким образом, гарантирует безопасность применения препарата для пациента в клинической практике.

Для эффективного контроля качества по указанному показателю условия проведения испытания должны быть стандартизованы. Основными параметрами, определяющими выявление ано-

мальной токсичности антибиотика является величина тест-дозы, вводимая животному внутривенно в объёме 0,5 мл, и скорость, с которой осуществляется введение [2].

В общей фармакопейной статье (ОФС 42-0060-07) «Аномальная токсичность» — основной тест Государственной фармакопеи (ГФ XII) [3] — указано, что испытуемые растворы в объёме 0,5 мл должны вводиться внутривенно со скоростью 0,1 мл в секунду, то есть объём 0,5 мл раствора должен быть введён в течение 5 секунд. Такая же скорость введения растворов при испытании на токсичность принята и в Фармакопее США (ФСША) [4]. В Европейской Фармакопее (ЕФ) [5] время введения тест-дозы препарата в 0,5 мл раствора составляет 15–30 секунд (то есть скорость введения — от 0,1 мл за 3 секунды до 0,1 мл за 6 секунд) [1].

Различие методических подходов ГФ XII и ЕФ к проведению испытания усложняет оценку качества антибиотиков по показателю «Аномальная токсичность».

Препарат, введённый внутривенно в одной и той же дозе, но с различной скоростью — 0,1 мл/с или (0,1 мл/3 с — 0,1 мл/6 с), может вызывать эффекты различной интенсивности, что

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, ФГБУ НЦЭСМП

приводит к получению неоднозначных результатов испытаний [1].

Антибиотики группы цефалоспоринов представляют самый многочисленный класс антибактериальных препаратов, получаемых полусинтетическим путём, для которых должен быть предусмотрен тест на «Аномальную токсичность».

В результате проведённого сравнительного анализа нормативной документации на зарегистрированные в России препараты этой группы антибиотиков установлено, что в настоящее время существует значительный разброс в величинах тест-доз и скорости введения для одного и того же препарата разных производителей. Например, для 30 из 31 зарегистрированного препарата цефтриаксона в лекарственной форме порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения, величина тест-дозы составляет — 30 мг на мышшь, но скорость введения различается и находится в диапазоне от 0,1 мл/с до 0,1 мл/12 с.

Исходя из этого, актуальным представляется изучение влияния скорости введения на выявление аномальной токсичности при оценке качества препаратов цефтриаксона.

Цель работы заключалась в изучении влияния параметра «скорость введения» при выполнении теста «Аномальная токсичность» на оценку качества антибиотика в сравнительном экспериментальном исследовании препаратов цефтриаксона на основе методических подходов ГФ XII и ЕФ.

## Материал и методы

Поскольку готовая лекарственная форма фактически представляет собой распылку субстанции (порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения), сравнительное исследование проводили на образцах субстанций цефтриаксона натрия зарубежных производителей (Китай):

- производитель № 1;
- производитель № 2;
- производитель № 3;
- производитель № 4;
- производитель № 5.

Эксперименты выполняли на белых мышках самках (ГУ НЦ «Биомедицинские Технологии» РАМН Филиала «Андреевка»). Животных содержали в виварии согласно санитарным правилам [6] на стандартном рационе, доступ к корму и воде «ad libitum» («по желанию»).

Перед опытом для стабилизации массы тела мышей лишали корма и воды. Через два часа их взвешивали, отбирали особей с массой тела  $20 \pm 1$  г в группы по 5 штук.

Как правило, в испытании на аномальную токсичность используется тест-доза равная ЛД<sub>10</sub>. Согласно данным доклинических исследований установлено, что для цефтриаксона значение максимально переносимой дозы (ЛД<sub>10</sub>) составляет 30 мг на мышшь и средней летальной дозы (ЛД<sub>50</sub>) — 50 мг на мышшь. В качестве тест-доз были выбраны дозы, близкие к ЛД<sub>10</sub> и ЛД<sub>50</sub>.

Испытуемые растворы вводили внутривенно в латеральную вену хвоста однократно в объёме 0,5 мл на мышшь согласно требованиям ГФ XII со скоростью 0,1 мл/с и ЕФ со скоростью 0,1 мл/3 с и 0,1 мл/6 с для каждой тест-дозы. За состоянием подопытных животных наблюдали на протяжении 48 часов, учитывали картину интоксикации и время гибели животных.

## Результаты и обсуждение

Внутривенное введение исследуемых серий субстанций производителей № 1 и № 2 в дозе 30 мг/мышшь со скоростью 0,1 мл в секунду не вызывало признаков интоксикации, а также гибель животных на протяжении всего периода наблюдения (табл. 1).

Однако введение образцов субстанций производителей № 3, № 4 и № 5 в той же дозе с той же скоростью сопровождалось возникновением у животных признаков интоксикации: нарушение дыхания и координации движения, клонико-тонические судороги. В течение 5 минут после введения испытуемых растворов отмечалась гибель животных (по 1 животному в каждой группе). Согласно требованиям ГФ, для данных субстанций было проведено повторное испытание. При этом образец субстанции производителя № 4 выдерживает испытание — гибели животных во второй группе не было отмечено (т.е. суммарно в двух опытах гибель составила 1 животное из 10), что соответствует требованиям ГФ XII. Образцы субстанций производителей № 3 и № 5 не выдержали испытание в соответствии с требованиями ГФ XII: суммарно в двух опытах у производителя № 3 отмечена гибель 3 животных из 10, у производителя № 5 — 2 животных из 10.

При введении образцов субстанций всех производителей в дозе 30 мг/мышшь со скоростью 0,1 мл в 3 секунды или 6 секунд наблюдалась хорошая переносимость без признаков интоксикации и гибели животных.

**Таблица 1.** Результаты испытания на аномальную токсичность образцов субстанций зарубежных производителей

Производитель	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
<b>Скорость введения</b>	<b>Гибель животных</b>				
	<b>Доза 30 мг/мышшь</b>				
0,1 мл/с	0/5	0/5	3/10	1/10	2/10
0,1 мл/3 с	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
0,1 мл/6 с	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	<b>Доза 50 мг/мышшь</b>				
0,1 мл/с	2/10	3/10	7/10	5/10	9/10
0,1 мл/3 с	0/5	0/5	2/10	0/5	5/10
0,1 мл/6 с	0/5	0/5	0/5	0/5	1/10

**Таблица 2.** Данные о растворителях, используемых при производстве субстанций зарубежными производителями

Производитель	Остаточные органические растворители	Класс токсичности	Норма по НД
№ 1	Тetraгидрофуран	II	контроль отсутствует
	Ацетон	III	не более 0,5%
№ 2	Ацетон	III	не более 0,2%
№ 3	Метанол	II	не более 0,3%
	Метиленхлорид	II	не более 0,06%
№ 4	Ацетон	III	не более 0,5%
	Метанол	II	не более 0,3%
	Ацетонитрил	II	не более 0,041%
	Метиленхлорид	II	не более 0,06%
№ 5	Ацетон	III	не более 0,5%
	Метанол	II	не более 0,3%
	Метиленхлорид	II	не более 0,06%
	Ацетонитрил	II	не более 0,041%
	Ацетон	III	не более 0,5%

При увеличении тест-дозы до ЛД<sub>50</sub> — 50 мг/мышь внутривенное введение растворов субстанций всех производителей со скоростью 0,1 мл в секунду сопровождалось нарастанием симптомов интоксикации и увеличением смертности животных в группах, ни одна субстанция не выдерживает тест.

Сопоставимые результаты получены при введении указанной дозы со скоростью 0,1 мл в 3 секунду: так же как и в случае с использованием ЛД<sub>10</sub> (30 мг/мышь) со скоростью 0,1 мл в секунду, — только три субстанции выдерживают испытание (табл. 1).

Таким образом, в случае, когда фирма-производитель проводит испытание по ЕФ (увеличивает время введения), тест-доза также должна быть увеличена — до 50 мг/мышь.

Различия в картине интоксикации, может быть связано с наличием неконтролируемых примесей или увеличением их числа. На уровень содержания примесей существенное влияние оказывают: технологический процесс производства, исходное сырье и вспомогательные вещества, используемые в процессе синтеза, при этом перечень технологических примесей для каждого производителя субстанции может различаться.

Анализ схем процесса производства исследуемых субстанций выявил, что все они производятся по разной технологии с использованием разных исходных компонентов, количества растворителей и их класса токсичности (табл. 2). Производители № 1 и № 2 используют меньшее количество растворителей в процессе получения субстанций, чем производители № 3, № 4 и № 5. Технология получения субстанции производителем № 3 включает стадию рекуперации растворителя II класса токсичности — метиленхлорида.

Сравнительный анализ нормативной документации (НД), сертификатов анализа на данные субстанции не выявил четкой зависимости между суммарным содержанием примесей и выявленными токсическими явлениями в полученных экспериментальных данных. Согласно НД для четырёх из

пяти производителей норма любой единичной примеси составляет не более 1,0%, суммы примесей — не более 4,0%, что соответствует монографии ЕФ (8.1). Для субстанции производителя № 2 нормы примесей меньше: любой единичной примеси — не более 0,5% и суммы примесей — не более 2,0%.

Следует отметить, что требования к контролю примесей цефтриаксона в ЕФ и ФСША различаются. В ЕФ нормируются неидентифицированные примеси: любой единичной примеси — не более 1,0%, суммы примесей — не более 4,0% (монография не пересматривалась с 2008 года). В ФСША предусмотрен контроль 7 идентифицированных примесей (норма только одной из них «не более 1,0%», другие идентифицированные примеси с нормами — «не более 0,5%», «не более 0,3%» и «не более 0,2%») и единичной неидентифицированной примеси с нормой — не более 0,2%, сумма примесей не должна превышать 2,5%.

Возможно, именно различие профиля неконтролируемых примесей определяет аномальную токсичность субстанций производителей № 3 и № 5. Исследование физико-химических параметров субстанций продолжается.

## Выводы

На основании проведенного исследования установлено, что:

1. для препаратов цефтриаксона натрия тест-доза — 30 мг/мышь при испытании на аномальную токсичность обоснована данными доклинических исследований острой токсичности.

2. для обеспечения гарантий безопасности препаратов цефтриаксона натрия контроль качества по показателю «Аномальная токсичность» рекомендуется проводить при соблюдении следующих параметров тестирования:

— при скорости введения 0,1 мл/с (ГФ XII) в тест-дозе близкой к ЛД<sub>10</sub> (30 мг/мышь);

— при уменьшении скорости введения до 0,1 мл/3 с (ЕФ) тест-доза должна быть увеличена до ЛД<sub>50</sub> (50 мг/мышь).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Неугодова Н. П., Долгова Г. В., Хайретдинова М. Н. и др. Процедура выполнения фармакопейного показателя «Аномальная токсичность» на примере антибиотиков. *Антибиотики и химиотер* 2008; 53: 7—8: 19—26.
2. Неугодова Н. П., Долгова Г. В., Померанцева Т. Я. и др. Влияние параметра «скорость введения» при выполнении теста «Испытание на токсичность». *Антибиотики и химиотер* 2009; 54: 1—2: 53—55.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации 12-е изд. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения 2007.
4. United States Pharmacopeia 37th edition. [Электронный ресурс] // United States Pharmacopeia Convention (<http://www.uspnf.com/uspnf/login>).
5. European Pharmacopeia 8.1th edition. [Электронный ресурс] // EDQM (<http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>).
6. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

*Шаройкина Мария Владимировна* — эксперт 2-й категории управления № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств;

*Рябцева Мария Сергеевна* — к.б.н., эксперт 2-й категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств;

*Ковалёва Елена Леонардовна* — д.ф.н., заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств;

*Неугодова Наталья Петровна* — к.б.н., начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.