

# ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.1.1.1.0019

Взамен ОФС.1.2.4.0007.15

## ИСПЫТАНИЕ НА ГИСТАМИН

Общая фармакопейная статья распространяется на метод определения содержания гистамина, применяемый при фармацевтической разработке лекарственных средств, а также при оценке пригодности технологического процесса в отношении возможности получения лекарственного средства, выдерживающего испытания на гистамин.

*Испытуемый раствор.* Испытуемый образец с концентрацией гистамина в пересчёте на гистамина дигидрохлорид в пределах от 1,3 мкг/мл до 2,5 мкг/мл.

Если максимальная концентрация гистамина в пересчёте на гистамина дигидрохлорид в испытуемом образце выше 2,5 мкг/мл, испытуемый образец разводят раствором 9 г/л *натрия хлорида* до расчётной концентрации гистамина дигидрохлорида 2,5 мкг/мл.

Если значение максимальной концентрации гистамина в пересчёте на гистамина дигидрохлорид в испытуемом образце меньше указанного предела или близко к его нижнему значению, допустимо увеличение объёма вводимого испытуемого образца до 1/20 от объёма ванночки.

При необходимости испытуемый образец растворяют раствором 9 г/л *натрия хлорида* до расчётной концентрации гистамина 1,3–2,5 мкг/мл.

*Растворы сравнения.* В качестве растворов сравнения используют растворы гистамина дигидрохлорида (квалификации ч. или ч.д.а):

- раствор сравнения 1 с концентрацией 1,3 мкг/мл;
- раствор сравнения 2 с концентрацией 2,5 мкг/мл;
- раствор сравнения 3 с концентрацией 5,0 мкг/мл, вызывающие 50 %, 75 % и 100 % сокращение кишки соответственно.

В качестве растворителя используют раствор 9 г/л *натрия хлорида*.

*Калия хлорида раствор.* 2,00 г калия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

*Кальция хлорида раствор.* 1,30 г кальция хлорида дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

*Магния хлорида раствор.* 2,10 г магния хлорида гексагидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

*Натрия дигидрофосфата раствор.* 0,58 г натрия дигидрофосфата моногидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

*Гипокальциевый раствор Тироде.* 80,0 г натрия хлорида, 10,0 г натрия гидрокарбоната и 11,0 г глюкозы в любой последовательности, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл. Полученный раствор переносят в стеклянную ёмкость с притёртой пробкой вместимостью 10 000 мл или полиэтиленовый сосуд с завинчивающейся крышкой того же объёма, в который последовательно переносят калия хлорида раствор, кальция хлорида раствор, магния хлорида раствор, натрия дигидрофосфата раствор, доводят объём водой до 10 000 мл и тщательно перемешивают. Раствор хранят при температуре от 3 °С до 5 °С не более суток. Помутневший раствор не используют.

*Раствор А*

Натрия хлорид	160,0 г
Калия хлорид	4,0 г
Кальция хлорид безводный	2,0 г
Магния хлорид безводный	1,0 г
Натрия дигидрофосфат додекагидрат	0,1 г
Вода	до 1000 мл

### *Раствор Б*

Раствор А	50,0 мл
Атропина сульфат	0,5 мг
Натрия гидрокарбонат	1,0 г
Глюкоза	0,5 г
Вода	до 1000 мл

Раствор Б используют свежеприготовленным или хранят не более суток.

В качестве дополнительной меры по предупреждению спонтанной активности изолированного органа, в состав гипокальциевого раствора Тироде добавляют атропина сульфат в концентрации 0,5 мг/л или применяют вместо раствора Тироде раствор Б.

### ПОДГОТОВКА ИЗОЛИРОВАННОГО ОРГАНА

Морскую свинку массой 200–350 г за сутки до испытания лишают пищи. После эвтаназии у свинки извлекают повздошную кишку длиной 2 см. Подготавливают подходящим методом и помещают в чашку Петри с гипокальциевым раствором Тироде, которым тщательно промывают с помощью шприца до полного удаления содержимого.

### РЕГИСТРИРУЮЩАЯ СИСТЕМА

Для регистрации сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение растворов сравнения и испытуемого раствора используют регистрирующую систему, состоящую из термостатируемой при температуре от 34 °С до 36 °С ванночки вместимостью от 10 мл до 20 мл с гипокальциевым раствором Тироде, а также электронного датчика (с подходящим регистрирующим устройством) или механического рычага с кимографом. Ванночку аэрируют карбогеном (95 % кислорода и 5 % углекислого газа) или воздухом. Применяют подходящую нагрузку. Натяжение кишечника должно быть около 9,8 мН и должно соответствовать чувствительности органа.

## МЕТОДИКА

Изолированный отрезок подвздошной кишки помещают в ванночку и прикрепляют к регистрирующей системе с помощью лигатуры по диагонали за противоположные концы: один – к крючку на дне ванночки, а другой – к датчику или рычагу. Прикладывают к отрезку нагрузку и оставляют его в покое на 30 мин. За это время необходимо не менее 3 раз сменить в ванночке гипокальциевый раствор Тироде.

### *1. АДАПТАЦИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ОТРЕЗКА ПОВЗДОШНОЙ КИШКИ МОРСКОЙ СВИНКИ К СУБМАКСИМАЛЬНОЙ ДОЗЕ ГИСТАМИНА*

В термостатируемую ванночку вводят раствор сравнения 3 в объёме, равном 1/100 от её ёмкости. Через 30 с (время экспозиции) ванночку промывают тройным объёмом гипокальциевого раствора Тироде (предпочтительно переливом без опорожнения ванны). После первого отмывания проводят второе таким же объёмом раствора. Не менее чем через 4 мин после первого введения снова повторяют цикл «введение – экспозиция – два отмывания». Эти циклы повторяют до достижения постоянной величины ответа отрезка кишки (не менее двух одинаковых пиков, высоту которых принимают за 100 %). Струю вводимого раствора направляют не прямо на изолированный отрезок кишки, а в сторону стенки ванночки, не меняя её направления. Скорость введения должна быть максимально высокой и постоянной. Регистрацию сокращений проводят непрерывно (скорость ленты 2 мм/мин). При использовании механического рычага и кимографа писчик во время отмывания отводят и прекращают запись. Временные интервалы между введениями испытуемого раствора и между двумя отмываниями должны быть постоянными.

## *2. ИСПЫТАНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА*

### *2.1. Предварительное испытание*

Однократно в случайном порядке с интервалом не менее 4 мин вводят раствор сравнения 1, раствор сравнения 3 и испытуемый раствор. Циклы «введение – экспозиция – два отмывания» должны быть аналогичны таковым при проведении адаптации органа к субмаксимальной дозе гистамина.

В случае если пик, полученный в ответ на введение испытуемого раствора, по высоте не меньше, чем пик раствора сравнения 1, проводят количественное определение содержания гистамина в испытуемом образце (см. п. 2.2). Если пик, полученный в ответ на введение испытуемого раствора, меньше пика раствора сравнения 1 или вообще отсутствует, проводят контрольное испытание (см. п. 2.3).

### *2.2. Количественное испытание испытуемого образца на гистамин*

В случайном порядке поочередно вводят раствор сравнения 1 и раствор сравнения 3 (1/100 от объёма ванночки), и испытуемый раствор (тот же объём введения, что и при предварительном испытании) до получения не менее четырёх пиков в ответ на введение каждого раствора. Получают среднее значение ответа отрезка кишки на каждый раствор. С помощью регрессионного анализа вычисляют параметры линейной зависимости среднего ответа кишки на введение растворов сравнения от логарифма их концентрации. Вычисляют концентрацию гистамина в том испытуемом растворе, которому соответствует средняя высота его пика, и рассчитывают содержание гистамина в испытуемом образце. Коэффициент пересчёта гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038.

### *2.3. Контрольное испытание*

Схема проведения контрольного испытания такая же, как и при количественном определении содержания гистамина в испытуемом образце, только вместо испытуемого раствора используют раствор сравнения 2 (1/100 от объёма ванночки). При соответствии средней высоты пика вводимой

концентрации гистамина дигидрохлорида в данном растворе (2,50 мкг/мл), результаты испытания считают достоверными.

Результаты испытания считают недостоверными, если:

1. Средняя высота пика раствора сравнения 2 не соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном растворе (2,50 мкг/мл).

2. При количественном определении содержания гистамина в испытуемом образце отсутствует воспроизводимость ответов отрезка кишки на введение испытуемого образца.

3. При испытании происходит значительное снижение высоты пиков.

В каждом из этих трёх случаев следует провести испытание лекарственных средств на вещества депрессорного действия в соответствии с ОФС «Испытание на депрессорные вещества».