

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.1.1.1.0019

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 Р* 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 Р* 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 Р*.

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

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

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

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

Гипокальциевый раствор Тироде. 80,0 г натрия хлорида *P*, 10,0 г натрия гидрокарбоната *P* и 11,0 г глюкозы *P* в любой последовательности, растворяют в воде *P* 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 *P* 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 для инъекций	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 для инъекций	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.

1. ПОДГОТОВКА ИЗОЛИРОВАННОГО ОРГАНА

Морскую свинку массой 200–350 г за сутки до испытания лишают пищи. После эвтаназии у свинки извлекают подвздошную 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.

2. 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.

3. 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.

3.1. АДАПТАЦИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ОТРЕЗКА ПОДВЗДОШНОЙ 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 четыре минуты 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.

3.2. ИСПЫТАНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

3.2.1. Предварительное испытание

Однократно в случайном порядке с интервалом не менее четырёх минут 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. раздел 3.2.2 *Количественное испытание испытуемого образца на гистамин*). Если пик, полученный в ответ на введение испытуемого раствора, меньше пика раствора сравнения 1 или вообще отсутствует, проводят контрольное испытание (см. раздел 3.2.3 *Контрольное испытание*).

3.2.2. Количественное испытание испытуемого образца на гистамин

В случайном порядке поочерёдно 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.

3.2.3. 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».