

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Биологические методы оценки
активности лекарственного
растительного сырья и
лекарственных препаратов,
содержащих сердечные гликозиды**

ОФС.1.2.4.0009.15

**Взамен ст. ГФ XII, ч.1,
ОФС 42-0065-07**

К лекарственному растительному сырью и лекарственным растительным препаратам, для которых проводится биологическая оценка активности сердечных гликозидов, относятся:

1. Листья наперстянки пурпуровой, крупноцветковой и их лекарственные препараты.
2. Лекарственные препараты наперстянки шерстистой.
3. Трава, лекарственные препараты горицвета.
4. Трава, листья, цветки ландыша, лекарственные препараты ландыша, сложные лекарственные формы, содержащие настойку ландыша.
5. Семена и лекарственные препараты строфанта.
6. Трава и семя желтушника раскидистого (серого), сложные лекарственные формы, содержащие желтушник серый и др.

Принцип метода биологической оценки

Биологическая оценка указанных выше лекарственных средств основана на способности сердечных гликозидов в токсических дозах вызывать систолическую остановку сердца животных.

Активность лекарственных средств, содержащих сердечные гликозиды, оценивают по сравнению с активностью стандартных образцов и выражают в единицах действия (ЕД).

Испытания проводят на лягушках разных видов. Устанавливают

наименьшие дозы стандартного образца и испытуемого лекарственного средства (испытуемого лекарственного растительного сырья/препарата), вызывающие систолическую остановку сердца подопытных животных. Затем рассчитывают содержание единиц действия в 1 г испытуемого лекарственного средства (ИЛС), если испытывается лекарственное растительное сырье или сухие концентраты; в одной таблетке – при испытании таблеток или в 1 мл, если испытываются жидкие лекарственные формы.

Стандартные образцы и понятие единицы действия

Стандартным образцом (СО) при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов ландыша, комплексных лекарственных препаратов, содержащих настойку ландыша, служат специально изготовленные спиртовые экстракты ландыша, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов ландыша.

СО при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов наперстянки пурпуровой и крупноцветковой служат специально полученные спиртовые экстракты наперстянки указанных видов, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов.

Стандартными образцами при испытании другого лекарственного растительного сырья и полученных из него лекарственных препаратов служат индивидуальные кристаллические гликозиды: при испытании лекарственных препаратов наперстянки шерстистой – целанид-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и препаратов горичвета – цимарин-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов строфанта – строфантин G-стандарт; лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов желтушника серого – эризимин-стандарт.

Биологическую активность стандартных образцов устанавливают на

лягушках-самцах (*Rana temporaria*) массой 28 – 33 г при подкожном введении в октябре-ноябре (таких лягушек условно называют «стандартными» или «нормальными»).

При испытании на лягушках разведения стандартных образцов подбирают с таким расчетом, чтобы одна лягушачья единица действия (1 ЛЕД) соответствовала дозе стандартного образца, вызывающей в определенных условиях опыта систолическую остановку сердца у большинства стандартных подопытных лягушек.

Под 1 ЛЕД ландыша или наперстянки подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртового образца, разведенного в 4 раза водой. Неразведенные стандартные образцы наперстянки и ландыша содержат в 1 мл 13,33 ЛЕД.

Под 1 ЛЕД цимарина, целанида подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

цимарина	1 : 13333
целанида	1 : 5000

Под 1 ЛЕД строфантина G, эризимины подразумевают специфическую биологическую активность 0,4 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

строфантина G	1 : 20000
эризимины	1 : 25000

Метод биологической оценки сердечных гликозидов на лягушках

Отбор лягушек и условия их содержания

Для опытов пригодны лягушки-самцы видов: травяная (*Rana temporaria*) массой 28 – 40 г; водяные – озерная (*Rana ridibunda*) и прудовая (*Rana esculenta*) массой 30 – 70 г.

Лягушек содержат в течение зимы в бассейне с проточной водой в полутемном помещении при температуре от 3 до 8 °С.

Содержащиеся в течение зимы в бассейне лягушки могут быть сразу

использованы для опыта. Весной и летом свежепойманных лягушек выдерживают до начала опыта в бассейне с проточной водой в течение 2 – 3 сут. Температура воды в бассейне в теплое время года не должна превышать 15 °С. Помещение лаборатории, в которой проводят биологические испытания, должно быть светлым, но защищенным от попадания прямых солнечных лучей, температура воздуха в нем – 15 – 22 °С. В лаборатории должна находиться раковина для содержания подопытных лягушек, в которую их помещают за 1 – 1,5 ч до проведения опыта.

Техника испытания и принцип расчета

Отбирают партию лягушек одного вида, возможно близких друг к другу по массе. Взвешивание животных проводят непосредственно перед опытом с точностью до 0,5 г с отклонениями от средней массы в группе не более чем на $\pm 2,5$ г: 28 – 33, 30 – 35, 35 – 40 и до 65 – 70 г.

Лягушек по 5 штук укрепляют на досках брюшком кверху с предельно вытянутыми конечностями, булавки вкалывают в верхнюю часть морды и в суставы передних и задних конечностей.

Пинцетом захватывают кожу на груди и вырезают в ней треугольное отверстие. Вырезанный лоскут кожи откидывают в сторону. При этом становится отчетливо видимой грудина, просвечивающая через мышцы, в виде белой пластины, напоминающей по форме песочные часы. Приподняв пинцетом грудину в узкой части, тонкими ножницами перерезают ее поперек выше и ниже места наложения пинцета, так что образуется узкое поперечное оконце, через которое видны дуги аорты и предсердия. Тонким (глазным) пинцетом проникают в разрез (осторожно, чтобы не поранить предсердия и крупные сосуды), слегка вытягивают сердечную сорочку и рассекают ее ножницами. Затем легкими надавливаниями на брюшко лягушки выводят сердце наружу. При препарировании следят за тем, чтобы через образованное отверстие не выступали наружу печень и легкие, и чтобы сердце свободно помещалось на лишенном кожи участке, не прикасаясь к наружной поверхности кожи. В течение опыта обнаженное сердце каждые 15 – 20 мин

смачивают натрия хлорида раствором 0,6 % (наносят пипеткой 2 – 3 капли на обнаженное сердце).

Испытания на травяных лягушках следует проводить, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка); на водяных лягушках – в сердце (в полость желудочка) или в вену; под кожу – только растворы, содержащие гликозиды ландыша.

Лягушкам, относящимся к одной группе (5 штук), вводят одинаковые дозы испытуемого раствора.

Испытуемые препараты предварительно разводят водой с таким расчетом, чтобы 0,3 или 0,4 мл испытуемого раствора содержали 1 ЛЕД. Для этого среднее количество единиц действия лекарственного средства умножают на количество миллилитров, соответствующее 1 ЛЕД. Например, если в 1 мл препарата «Коргликон раствор 0,06 % для инъекций» содержится в среднем 13,3 ЛЕД ($13,3 \cdot 0,3 = 3,99$), то препарат следует развести 1:4.

1. Метод испытания при введении под кожу. Растворы вводят шприцем с тонкой иглой в бедренные лимфатические мешки лягушек. Дозы, не превышающие 0,35 мл, вводят в одну конечность, большие дозы (но не более 0,7 мл) вводят равными частями в обе конечности.

После введения раствора наблюдают за лягушками и определяют наименьшую дозу, вызывающую систолическую остановку сердца у большинства из 5 лягушек данной группы в течение 1 ч, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; или в течение 2 ч, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты строфанта или желтушника. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, продолжают наблюдение еще 10 мин (при длительности наблюдения 1 ч) и учитывают также количество лягушек, у которых остановка сердца наступила в дополнительное время. Длительность систолической остановки сердца должна быть не менее 15 мин. Лягушек, у которых сердце начинает вновь сокращаться ранее, чем через 15 мин после остановки, в расчет не

принимают.

В протоколах опытов отмечают время введения ИЛС и результаты опытов для каждой лягушки в отдельности. Каждое отдельное испытание начинают с определения чувствительности данной партии лягушек к стандартному образцу. С этой целью нескольким группам (по 5 лягушек с одинаковой массой тела в каждой) вводят различные дозы стандартного образца: первой группе – дозу, соответствующую 1 ЛЕД (по 0,3 или 0,4 мл в зависимости от образца); другим – на 0,05 – 0,1 мл больше. Находят наименьшую дозу стандартного образца, вызывающую остановку сердца у большинства из 5 лягушек. Если остановка наблюдается у всех лягушек, то переходят к испытанию меньшей дозы, а если остановки были у одного или двух животных или не наблюдались вообще, то доза ИЛС увеличивается. Таким образом, определяется чувствительность опытной партии лягушек по сравнению со стандартными лягушками. Затем в тех же условиях опыта группе из 5 лягушек той же партии вводят раствор ИЛС в дозе, соответствующей найденной наименьшей дозе стандартного образца, и наблюдают за животными в течение 1 или 2 ч (в зависимости от того, какое лекарственное средство испытывается). Если в результате наблюдений будет установлено, что введенная доза недостаточна или слишком велика, дозу увеличивают или уменьшают, причем разница между дозами должна быть не более 0,1 мл. Опыты проводят до тех пор, пока не будет найдена наименьшая доза ИЛС, вызывающая систолическую остановку сердца у большинства из 5 лягушек.

Далее рассчитывают содержание единиц действия (X) в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке ИЛС.

Для лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов наперстянки, ландыша, горицвета расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K}{0,3 \cdot A},$$

где A – наименьшая доза в мл, установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза в мл, установленная для раствора стандартного образца;

0,3 – доза в мл, соответствующая 1 ЛЕД;

K – число, обозначающее разведение ИЛС.

Для лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов строфанта и желтушника расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K}{0,4 \cdot A}$$

2. Метод испытания при введении в полость желудочка сердца.

Испытуемые растворы, предварительно освобожденные от избытка спирта (его концентрация не должна превышать 10 %) и летучих веществ, в соответствующем разведении вводят лягушкам непосредственно в полость желудочка сердца со скоростью 0,1 мл в 5 с, прокалывая его в момент диастолы тонкой иглой, соединенной со шприцем с делением 0,02 мл. Иглу вынимают из полости желудочка во время систолы, чтобы избежать кровотечения в месте укола.

Для определения наименьшей дозы раствора СО и ИЛС травяным лягушкам вводят примерно 0,2 мл лекарственного препарата наперстянки, ландыша, горицвета или 0,3 мл лекарственного препарата строфанта, желтушника. Допустимое отклонение между вводимыми дозами – 0,02 мл.

При определении активности на водяных лягушках рассчитывают вводимую дозу на 1 г массы тела. Для того чтобы не рассчитывать каждый раз дозу на введение, предлагается таблица расчетных доз. Допустимое отклонение между вводимыми дозами должно быть не более 0,0005 мл на 1 г массы лягушки. Наименьшими дозами обычно являются 0,004 – 0,006 мл раствора на 1 г массы лягушки.

Таблица – Дозы лекарственного средства в мл, рассчитанные для водяных лягушек, при оценке лекарственных средств, содержащих сердечные гликозиды, при внутрисердечном и внутривенном пути введения

Средняя масса лягушки, г	Доза лекарственного средства на 1 г массы лягушки, мл									
	0,0030	0,0035	0,0040	0,0045	0,0050	0,0055	0,0060	0,0065	0,0070	0,0075
30	0,09	0,10	0,12	0,14	0,15	0,17	0,18	0,20	0,21	0,23
35	0,11	0,12	0,14	0,16	0,18	0,19	0,21	0,23	0,25	0,26
40	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30
45	0,14	0,16	0,18	0,20	0,23	0,25	0,27	0,29	0,32	0,34
50	0,15	0,18	0,20	0,23	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38
55	0,17	0,19	0,22	0,25	0,28	0,30	0,33	0,36	0,39	0,41
60	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45
65	0,20	0,23	0,26	0,29	0,33	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49
70	0,21	0,25	0,28	0,32	0,35	0,39	0,42	0,46	0,49	0,53
75	0,23	0,26	0,30	0,34	0,38	0,41	0,45	0,49	0,53	0,56

Длительность наблюдения за лягушками – 15 мин, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; для лекарственных препаратов строфанта, желтушника – 20 мин. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, наблюдение продолжают еще 5 мин. Лягушек, у которых сердце начинает вновь сокращаться ранее, чем через 5 мин после остановки, в расчет не принимают.

Вычисляют содержание ЛЕД в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке испытуемого образца по формулам, приведенным для подкожного введения, но значения A и B зависят от принципа расчета доз, т.е. от вида использованных лягушек:

A – наименьшая доза (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), установленная для раствора стандартного образца.

3. *Метод испытания при введении в вену.* У лягушек проводят поперечный разрез кожи на уровне ключиц, затем по средней линии живота до симфиза, где надсекают кожу вправо и влево. Образовавшиеся лоскуты кожи отводят в стороны. На внутренней поверхности после отведения в сторону лоскутов кожи с каждой стороны видна большая кожная вена в виде

петли, идущей по поверхности прямой мышцы живота от кожи спины книзу, а затем снова вверх, где она впадает в верхнюю полую вену. Затем выводят наружу сердце аналогично методу испытания при введении под кожу. Доску с группой препарированных лягушек поворачивают так, чтобы их головы были обращены к экспериментатору для удобства введения иглы в нисходящее колено петли вены лягушки.

При внутривенном введении лягушкам растворов СО и ИЛС в соответствующем разведении, освобожденных от избытка спирта и летучих веществ, рассчитывают вводимую дозу на 1 г массы тела (таблица).

Относящимся к одной группе 5 лягушкам вводят в вену одинаковые дозы раствора стандартного образца или ИЛС тонкой иглой, соединенной со шприцем вместимостью 1 мл, со скоростью 0,1 мл за 5 с. После каждого введения накладывают кровоостанавливающие зажимы, которые не снимают до конца опыта. Время наблюдения за остановкой сердца лягушки – 15 мин, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; для лекарственных препаратов строфанта, желтушника – 20 мин. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, наблюдение продолжают еще 5 мин; о результатах судят по изменениям, наступающим в дополнительное время.

Определение наименьшей дозы стандартного образца и ИЛС, вызывающей систолическую остановку сердца у большинства лягушек из 5, проводят так же, как при введении под кожу. Допустимое отклонение между вводимыми дозами должно быть не более 0,0005 мл на 1 г массы лягушки.

Наименьшими дозами обычно являются 0,004 – 0,006 мл раствора на 1 г массы лягушки.

Вычисляют содержание ЛЕД в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке ИЛС по формулам, приведенным для подкожного введения, но с другими обозначениями *A* и *B*:

A – наименьшая доза (в мл на 1 г массы лягушки), установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза (в мл на 1 г массы лягушки), установленная для раствора стандартного образца.