

9. Novozhytska Yu.M., Ivanova O.V., Bondarets O.V. (2013). Metodichni rekomendatsiyi z validatsiyi skryninhovykh ta pidtverdzhuyuchykh metodiv vyznachennya zalyshkovykh kilkostey veterynarnykh preparativ metodom hazovoyi ta ridynnoyi [The methodical pointing for the validation of screening and confirmatory methods for determination residues of veterinary drugs by gas and liquid chromatography] [in Ukrainian].

10. Tochnost (pravilnost i precizionost) metodov i rezultatov izmerenia. Chast 2. Osnovnoi metod opredeleniia povtoriaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmereniia [Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method] (2002). HOST R ISO 5752-2-2002 from 01 November 2002. Moskow: Izdatelstvo standartov [in Russian].

**УДК 577.3:621.384.8:547.495.9**

**ЛИСИЦЯ А.В.**, канд. биол. наук, доц., e-mail: lysyca@ukr.net

*Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН*

### **ВИЗНАЧЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ СУМІСНОСТІ ПГМГ З БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ МЕТОДОМ МАС- СПЕКТРОМЕТРІЇ**

*За допомогою методу мас-спектрометрії (МС) досліджено композиції полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) з такими біологічно активними речовинами, як антибіотик тілозин і препарат протипаразитарної дії івермектин. Визначено фармацевтичну сумісність цих сполук. Також проаналізовано фарсумісність та доцільність комбінування в одному комплексному препараті антихолінергетичного засобу аміридину гідрохлориду з вітаміном піридоксином і ПГМГ. Показано, що метод МС досить ефективний при визначенні фармацевтичної сумісності інгредієнтів в біотехнології, при розробці та випробуваннях нових лікувально-профілактичних препаратів для ветеринарної медицини.*

**Ключові слова:** *полігексаметиленгуанідин, мас-спектрометрія, фармацевтична сумісність, лікувально-профілактичні препарати.*

**Вступ.** Одним з актуальних питань сучасної ветеринарної медицини є розробка нових ефективних лікувально-профілактичних препаратів. Частіше за все їх склад багатокомпонентний і містить декілька інгредієнтів. Солі полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) зазвичай застосовують в складі різноманітних дезінфектантів і антисептиків. Вони малотоксичні, екологічно безпечні і мають бактерицидну, віруліцидну і фунгіцидну дію [1]. Разом з тим, при розробці нових препаратів не виключене поєднання ПГМГ з іншими біологічно активними речовинами (БАР). В цьому випадку слід враховувати можливість фармацевтичної несумісності інгредієнтів. Далеко не завжди її можна визначити за явними ознаками хімічних взаємодій (випадіння осаду, зміна кольору, газовиділення, помутніння тощо). Тому одним з найефективніших методів визначення стану молекул окремих речовин в сумішах є метод мас-спектрометрії (МС) [2]. Завдяки МС можна не лише чітко ідентифікувати всі складові багатокомпонентних або комплексних препаратів, а

й визначати зміни складових за хімічними ознаками (розкладання молекул, утворення нових сполук та ін.). Досить інформативною є часопролітна плазмово-десорбційна мас-спектрометрія (time-of-flight plasma desorption mass spectrometry або TOF-PDMS) з іонізацією зразка уламками поділу ядер каліфорнію-252 ( $^{252}\text{Cf}$ ) [3, 4]. Однією з основних переваг цього методу є можливість отримання на мас-спектрах чітких піків молекулярних та квазімолекулярних іонів (КМІ) окремих речовин, а також їх комплексів або похідних. В TOF-PDMS відбувається „м'яка” іонізація зразка, значна частина молекул органічних речовин при цьому зберігає свою структуру. Тому можливе безпосереднє визначення стану молекул БАР в природних або штучних сумішах або у різних за приналежністю субстанція, в т.ч. в комплексних лікувально-профілактичних препаратах, дезінфектантах та ін.

**Мета роботи:** визначити за допомогою методу мас-спектрометрії фармацевтичну сумісність солей ПГМГ з деякими протипаразитарними засобами і антибіотиками для розробки нових лікувально-профілактичних препаратів.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили на мас-спектрометрі біохімічному МСБХ-01 з іонізацією зразка уламками ділення ядер  $^{252}\text{Cf}$  (АТ "SELMІ", м. Суми, Україна). Підготовка зразків до мас-спектрометричних досліджень і самі експерименти проводилися за методиками валідованими для методу TOF-PDMS [2, 5]. В окремих випадках для підготовки зразків використовували спеціальний пристрій УНП-2 (АТ "SELMІ", м. Суми, Україна).

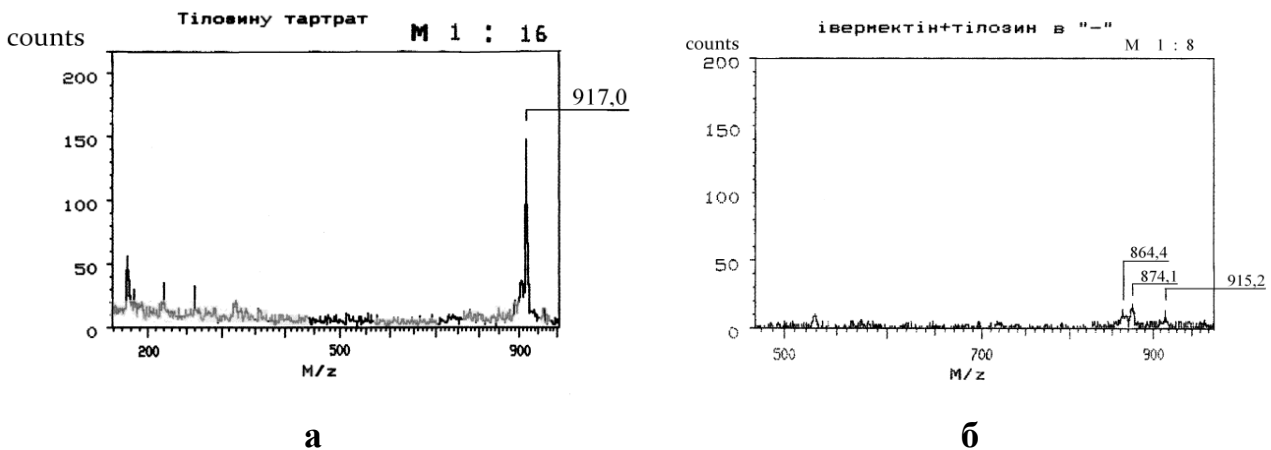
Випробовували солі ПГМГ хлорид (ПГМГхл) і ПГМГ малеат (ПГМГм) (ПП „Терміт”, м. Рівне, Україна), та їх суміші в різних пропорціях з фармакопейними зразками івермектину ( $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{14}$ , молекулярна маса або М.м. = 875,1 Да), тілозину тартрату ( $\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{O}_{17}\text{N}$ , М.м. = 916 Да), аміридину гідрохлориду (9-аміно-2,3,5,6,7,8-гексагідро-1Н-циклопента [в] хіноліну гідрохлориду моногідрат, М.м. = 188 Да), вітаміну  $B_6$  (піридоксин або 2-метил-3-окси-4,5-ди-[оксиметил]-піридину гідрохлорид, М.м. = 169,2 Да). М.м. солей ПГМГ, в т.ч. їх олігомерів, знаходилася в межах від 0,3 до 10,0 кДа. Зразки розчиняли в дистильованій воді, в окремих випадках застосовували етанол, пропіленгліколь або ацетон («Хімлаборреактив», м. Київ, Україна).

Мас-спектри препаратів знімали як безпосередньо в день розведення і змішування, так і через певні інтервали часу, періодично протягом всього визначеного терміну моніторингу (12 місяців). При проведенні аналізів використовували прискорюючи напруги МСБХ +10 або -10 кВ, тобто, знімали мас-спектри як позитивних, так і негативних іонів. Більшість сполук утворює при іонізації в TOF-PDMS значну кількість саме позитивно заряджених іонів, тому спектри в „+” іонах інформативніші та легше піддаються інтерпретації. Об'єм накопичуваних даних подій розпаду  $^{252}\text{Cf}$  (стартів) становив від 4 000 до 12 000, ширина каналу детектування 1 нс/канал, режим віднімання постійного фону. На рисунках наведено мас-спектри отримані за допомогою спеціальної комп'ютерної програми керування, накопичення та обчислення даних (МСБХ,

версія 4.0/m). На осі абсцис відкладається  $m/z$ , тобто, відношення маси іону ( $m$ ) до його заряду ( $z$ ), для однозарядних іонів – це фактично їх маса; по осі ординат – кількість накопичених іонів (інтенсивність піків).

**Результати досліджень та їх обговорення.** В першому випадку було випробувано суміші солей ПГМГ з івермектином і тілозину тартратом. Відомо, що івермектину притаманна переважно протипаразитарна дія, а тілозин – антибіотик. Подібна комбінація обрана не випадково, івермектин і тілозин є основними компонентами деяких протипаразитарних препаратів, наприклад, офтальмологічного засобу «Офтальмо-гель» [6]. Препарат застосовують у ветеринарній медицині з лікувально-профілактичною метою при телязіозі (дрібні нематоди роду *Thelazia*), блефариті, кон'юнктивіті та інших захворюваннях очей, а також при лікуванні отитів паразитарної етіології (отодекоз, саркоптоз та ін.).

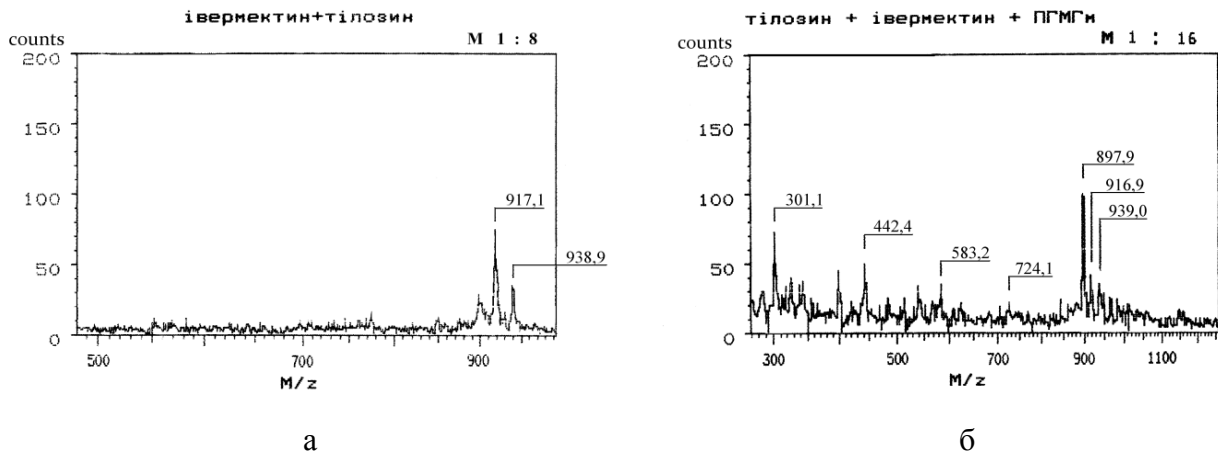
МС аналіз не виявив жодних ознак фармацевтичної несумісності інгредієнтів. На мас-спектрі тілозину чітко видно його КМІ, або протонований молекулярний іон  $[M + H]^+$  з  $m/z$  917 (рис. 1.а). На спектрі суміші тілозину з івермектином в негативних іонах наявні піки обох сполук,  $m/z$  915 – КМІ  $[M - H]^-$  тілозину,  $m/z$  874 – КМІ або депротонований іон  $[M - H]^-$  івермектину,  $m/z$  864 також один з КМІ івермектину (рис. 1.б).



**Рис. 1. Мас-спектри TOF-PDMS:** а – тілозину тартрат в позитивних іонах; б – суміш івермектину і тілозину тартрату в негативних іонах.

На спектрі суміші тілозину з івермектином в позитивних іонах помітні піки двох КМІ тілозину  $[M + H]^+$  з  $m/z$  917 і  $[M + Na]^+$  з  $m/z$  939, івермектин в позитивних іонах зазвичай не десорбується зі зразка (рис. 2.а).

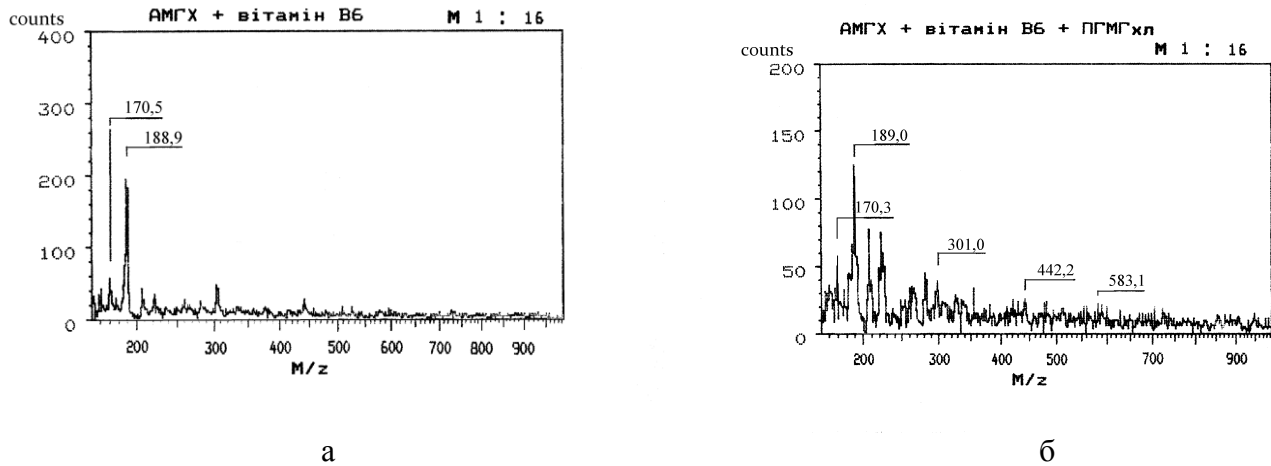
Мас-спектр композиції тілозину, івермектину і ПГМГ малеату містить незмінні  $m/z$  917 і  $m/z$  939 тілозину, олігомери ПГМГм з  $m/z$  301, 442, 583 і навіть з'являється КМІ  $[M + Na]^+$  івермектину з  $m/z$  898 (рис. 2.б). Це дає підстави стверджувати, що випробувані інгредієнти фармацевтично сумісні. Тому, солі ПГМГ можна застосовувати для підсилення лікувальних (бактерицидних та віруліцидних) властивостей цього офтальмологічного засобу.



**Рис. 2. Мас-спектри TOF-PDMS в позитивних іонах:** а – суміші івермектину і тілозину тартрату; б – суміші івермектину, тілозину і ПГМГ малеату.

В іншому випадку досліджували суміші ПГМГхл з вітаміном  $B_6$  та аміридину гідрохлоридом (АМГХ). Оскільки всі три сполуки є гідрохлоридами, то ймовірність їх хімічної взаємодії низька, але все ж вимагає перевірки. Подібна композиція має фармакологічний сенс і може проявляти лікувальний ефект при внутрішньом'язовому введенні. Відомо, що АМГХ (похідний ціаніміну) володіє антихолінестеразною та нейротропною дією, він використовується у ветеринарній медицині при лікуванні хвороб пов'язаних з порушеннями нервової системи [7]. Для підвищення ефективності лікування чуми м'ясоїдних, хвороби Тешена у свиней та інших інфекційних захворювань тварин пов'язаних з ураженнями центральної нервової системи, АМГХ доцільно комбінувати з вітамінами, наприклад з  $B_2$  (рибофлавін),  $B_6$  або  $B_{12}$  (ціанокобаламін). А комбінування АМГХ і вітаміну  $B_6$  з ПГМГ може бути виправдано, в першу чергу, необхідністю послаблення нейротоксичної дії останнього [8]. По-перше, відомо, що при отруєнні солями ПГМГ спостерігається  $B_6$ -дефіцитний стан [1], по-друге, внутрішньом'язеве (або парентеральне) введення ПГМГ можливе для локального впливу на окремі групи клітин (інгібування проліферативної активності, стимулювання мітозу, захист від вірусів).

На мас-спектрі суміші АМГХ з вітаміном  $B_6$ , витриманої за кімнатної температури в темному місці 38 місяців, наявні в незмінному стані всі типові піки обох сполук. А саме:  $m/z$  170,5 належить протонованому молекулярному іону піридоксину  $[M+H]^{++}$ ,  $m/z$  188,9 – протонований молекулярний іон аміридину  $[M+H]^{++}$  (рис. 3.а). На спектрі композиції АМГХ + вітамін  $B_6$  + ПГМГхл (рис. 3.б), витриманої 12 місяців, також наявні характерні піки всіх інгредієнтів. Зокрема піридоксину ( $m/z$  170,3), АМГХ ( $m/z$  189,0) і ПГМГ ( $m/z$  301, 442, 583). Утворення нових сполук не виявлено. Отже, проведений МС аналіз дозволяє стверджувати, що ці речовини мають фармацевтичну сумісність і можуть бути використані в одному комплексному лікувально-профілактичному препараті.



**Рис. 3. Мас-спектри в позитивних іонах сумішей:** а – АМГХ з вітаміном  $B_6$ ; б – АМГХ з вітаміном  $B_6$  і ПГМГхл.

**Висновки і перспективи подальших досліджень.** За допомогою методу мас-спектрометрії досліджено фармацевтичну сумісність солей ПГМГ з деякими БАР. Визначено, що ПГМГ сумісний з компонентами офтальмологічного засобу, який містить івермектин і тілозин. Також ПГМГ можна поєднувати в одному препараті з АМГХ і піридоксином. Подібне поєднання є фармакологічно виправданим з огляду на потенційну нейротоксичну дію ПГМГ. Отримані результати дозволяють більш обґрунтовано підходити до підбору інгредієнтів в біотехнології та при розробці нових лікувально-профілактичних препаратів для ветеринарної медицини. В подальшому доцільно випробувати нові фармакологічно виправдані композиції ПГМГ з іншими БАР.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Воинцева И.И.* Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы / И.И. Воинцева, П.А. Гембицкий. – М.: ЛКМ-пресс. – 2009. – 304 с.
2. *Лисиця А.В.* Ідентифікація біологічно активних речовин в складних сумішах за допомогою плазмово-десорбційної мас-спектрометрії / Лисиця А.В. // Наук. вісник нац. аграрного ун-ту. – 1998. – № 11. – С. 166–170.
3. *Macfarlane R.D.* 252-Cf-Plasma Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry / Macfarlane R.D., Torgerson D.F. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Ph. – 1976. – V. 21. – P. 81–92.
4. *Сысоев А.А.* Масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления ядер калифорния-252 / Сысоев А.А., Артаев В.Б. // Журнал аналитической химии. – 1991. – Т. 46. – № 1. – С. 6–18.
5. *Мандигра М.С.* Метод мас-спектрометрії як один із підходів до розробки і випробування нових лікувально-профілактичних препаратів / Мандигра М.С., Лисиця А.В., Дмитрієв І.М. // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. – 2005. – Вип. 6. – № 3. – С. 259–264.
6. Бровафарма. Каталог препаратів ветеринарної медицини / Под ред. Шевченко А.Н. – К.: ООО «Бровафарма», 2013. – 126 с.
7. *Лисиця А.В.* Мас-спектрометричне та біохімічне вивчення антихолінергетичного препарату аміридину гідрохлориду / Лисиця А.В., Бялецький С.А. // Матеріали наук.-метод. семінару “Лабораторна вет. медицина: фіз.-хім. методи досліджень”. – Рівне: ІЕ УААН. – 1998. – С.156–157.

8. Гаврикова В.С. Вплив полігексаметиленгуанідину на біопродукційні параметри молоді риб / Гаврикова В.С., Ігнатюк О.А., Чумак В.Л. // Наукові вісті НТУУ «КП». – 2010. – № 3. – С. 16–20.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ ПГМГ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ / Лисица А.В.

С помощью метода масс-спектрометрии (МС) исследованы композиции солей полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) с такими биологически активными веществами, как антибиотик тилозин и препарат противопаразитарного действия ивермектин. Определена фармацевтическая совместимость этих соединений. Так же проанализирована фармсовместимость и целесообразность сочетания в одном комплексном препарате антихолинэстеразного средства амиридина с витамином пиридоксином и ПГМГ. Показано, что метод МС весьма эффективен при определении фармацевтической совместимости ингредиентов в биотехнологии, при разработке и испытаниях новых лечебно-профилактических препаратов для ветеринарной медицины.

**Ключевые слова:** полигексаметиленгуанидин, масс-спектрометрия, фармацевтическая совместимость, лечебно-профилактические препараты.

#### DETERMINATION OF PHARMACEUTICAL COMPATIBILITY PHMG WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES BY MASS SPECTROMETRY / Lysytsya A.V.

**Introduction.** Polyhexamethyleneguanidine (PHMG) has disinfectant and antiseptic properties. PHMG salts are low toxic and environmentally friendly, and they have bactericidal, virucidal and fungicidal action. PHMG can be combined with other biologically active substances for the development of new drugs. It is necessary to determine the compatibility of pharmaceutical ingredients in such case. The method of mass spectrometry is effective in determining the status of individual molecules of substances in mixtures.

**The goal of the work.** To determine pharmaceutical compatibility of PHMG salts with some drugs using mass spectrometry method for the development of new health care products.

**Materials and methods of research.** Compositions of PHMG salts with other biologically active substances were studied using mass spectrometry (MS). We used time-of-flight plasma desorption mass spectrometry (TOF-PDMS) with sample ionization fission fragments of californium-252 ( $^{252}\text{Cf}$ ). We analyzed several new compositions: PHMG with antibiotic tylosine, ivermectine, pyridoxine, amiridine hydrochloride.

**Results of research and discussion.** The ivermectine has antiparasitic properties and tylosine – is antibiotic. This combination is chosen not by chance, ivermectin and tilozyn are major components of some antiparasitic drugs, such as ophthalmic product "Ophthalmia-gel". MS analysis found no signs of incompatibility of pharmaceutical ingredients. Thus, PHMG salt can be used to enhance the therapeutic (bactericidal and virucidal) properties of the ophthalmic product. PHMG chloride composition with vitamin pyridoxine and amiridine hydrochloride was investigated in another experiment. MS analysis showed that these compounds are pharmaceutically compatible, the main ingredients in the solution remained unchanged during the whole observation time (12 months).

**Conclusions and prospects for further research.** We have shown that the use of MS method entirely justified in the design and testing of new therapeutic and preventive drugs. Pharmaceutical compatibility of ingredients can be determined by this method. PHMG compatible components ophthalmic product containing ivermectin and tylosine. PHMG also can also be combined with vitamin pyridoxine and anticholinesterase drugs the amiridine hydrochloride.

**Keywords:** polyhexamethyleneguanidine, mass-spectrometry, pharmaceutical compatibility, medical and preventive drugs.

REFERENCES

1. Voinceva, I.I. & Gembickij, P.A. (2009). *Poliguanidiny – dezinfekcionnye sredstva i polifunkcional'nye dobavki v kompozicionnye materialy [Polyguanidine - disinfectants and multifunctional additives in composites]*. Moscow: LKM-press [in Russian].
2. Lysyca, A.V. (1998). Identifikacija biologichno aktyvnyh rečovyn v skladnyh sumishah za dopomogoj plazmovo-desorbciyjnoi mas-spektrometrii [Identification of biologically active substances in complex mixtures by using of plasma desorption mass spectrometer]. *Naukovy visnik Nacionalnogo agrarnogo universitetu – Research Bulletin of the National Agrarian University, 11*, 166–170 [in Ukrainian].
3. Macfarlane, R.D. & Torgerson, D.F. (1976). 252-Cf-Plasma desorption time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Ph.*, 21, 81–92.
4. Sysoev, A.A. & Artaev, V.B. (1991). Mass-spektrometrija s ionizaciej oskolkami delenija jader kalifornija-252 [Mass spectrometry with ionization of fission fragments of californium-252]. *Zhurnal analiticheskoj himii – Journal of Analytical Chemistry, Vol. 46, 1*, 6–18 [in Russian].
5. Mandygra, M.S., Lysyca, A.V. & Dmytriev, I.M. (2005). Metod mas-spektrometrii jak odin iz pidhodiv do rozrobky i vyprobuvannja novyh likuval'no-profilaktychnyh preparativ [The mass spectrometry method as an approach to the development and testing of new therapeutic and preventive agents]. *Naukovo-tehnichny bjuleten Institutu biologii tvaryn i DNDKI vetpreparativ ta kormovyh dobavok – Scientific and technical bulletin of the Institute of Animal Biology and SSRCI of veterinary drugs, Vol. 6, 3*, 259–264 [in Ukrainian].
6. Shevchenko, A.N. (Eds.). (2013). *Brovafarma. Katalog preparatov veterinarnoj medicyny [Brovafarma. Catalog of Veterinary Medicine ]*. Kyiv: LLC «Brovafarma» [in Russian].
7. Lysyca, A.V. & Bjalecky, S.A. (1998). Mas-spektrometrychne ta biochimichne vyvchennja antycholinesteraznogo preperatu amirydynu hidrochlorydu [Mass spectrometry and biochemical study of anticholinesterase drugs the amiridine hydrochloride]. *Laboratory wet. medicine: physical and chemical research methods: Naukovo-metodychny seminar – Scientific methodological workshop.* (pp. 156–157). Rivne: IE UAAS [in Ukrainian].
8. Gavrikova, V.S., Ignatuk, O.A. & Chumac, V.L. (2010). Vplyv polihexamethylenguanidinu na bioprodukcijni parametry molodi ryb [Impact of polyhexamethyleneguanidine to bioproductive options of young fish]. *Naukovi visti NTUU «KP» – Science news NTU "KP", 1*, 16–20 [in Ukrainian].

УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22

МАЗУР Н.В. \*

МАЗУР М.В. \*\*,

ПОЛУПАН І.М., канд. вет. наук

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

НЕДОСЬКОВ В.В., д-р вет. наук, проф.

*Національний університет біоресурсів та природокористування України*

**ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОСТИМУЛЮЮЧИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА  
АНТИРАБІЧНОЇ ВАКЦИНАЦІЇ**

*В статті наведені результати досліджень впливу імуностимулюючих препаратів різного походження («РБС», «Ронколейкін» та «Фоспреніл») за антирабічної вакцинації,*

\* Аспірант, наук. керівник – д-р вет. наук, проф., Недосєков В.В.

\*\* Аспірант, наук. керівник – канд. вет. наук, ст. наук. сп., Полупан І.М.