

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ: ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

В.Г. Николаев<sup>1</sup>, И.И. Геращенко<sup>2</sup>, Н.Т. Картель<sup>2</sup>, Н.М. Гурина<sup>1</sup>,  
О.Н. Бакалинская<sup>2</sup>, В.В. Сарнацкая<sup>1</sup>, Е.А. Снежкова<sup>1</sup>,  
К.И. Бардахивская<sup>1</sup>, Л.А. Сахно<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р.Е. Кавецкого Национальной академии наук Украины  
ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

<sup>2</sup>Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

*В статье изложена методология оценки физико-химических, в том числе адсорбционных и каталитических, свойств энтеросорбентов, их состава и потенциальной биологической активности, что составляет первый этап доклинического изучения препаратов этой группы. Материалы статьи послужили основой для Главы 1 Методических рекомендаций Государственного экспертного центра МЗ Украины.*

### Введение

Энтеросорбция – один из основных методов эфферентной терапии, состоящий в пероральном приеме значительных доз специально подобранных поглотителей (энтеросорбентов) и направленный на связывание присутствующих в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) экзогенных и эндогенных токсинов, ксенобиотиков, шлаковых и патогенных метаболитов [1, 2]. Кроме этого, как разновидность энтеросорбции рассматривают детоксикацию кишечника путем введения через зонд взвесей сорбентов интраоперационно и в раннем послеоперационном периоде в абдоминальной хирургии [3].

К энтеросорбентам относят как лекарственные средства, так и диетические добавки, способные связывать токсические вещества и метаболиты в ЖКТ за счет реализации механизмов адсорбции, абсорбции, ионообмена или комплексообразования [4]. Особенностью энтеросорбентов является отсутствие собственной фармакокинетики, поскольку они, как правило, нерастворимы и не всасываются из ЖКТ.

Современная классификация энтеросорбентов базируется на их химической природе [3, 5] и выглядит следующим образом:

1. углеродные энтеросорбенты I–IV поколений;
2. синтетические энтеросорбенты на основе силоксановой связи (кремнийорганические соединения, аэросилы);
3. природные и синтетические алюмосиликаты, глины – производные оксидов алюминия и кремния;
4. энтеросорбенты на основе природных органических волокон («пищевые волокна») – производные полисахаридов, полифенолов и других соединений;
5. энтеросорбенты на основе природных и синтетических смол, синтетических полимеров, неперевариваемых липидов, липосом и микрогранул;
6. комбинированные препараты, в состав которых могут входить два и более типа указанных энтеросорбентов;

Несмотря на значительное количество экспериментальных и клинических работ по энтеросорбции, в настоящее время отсутствует устоявшееся представление о методах доклинической оценки и сравнения свойств различных энтеросорбентов, что особенно важно для разработки новых препаратов этого класса. В данной работе содержится

краткое описание методов оценки *in vitro* физико-химических свойств энтеросорбентов, их состава и потенциальной биологической активности, что составляет первый этап доклинического изучения препаратов этой группы (второй этап включает тесты *in vivo*, характеризующие безвредность препарата, третий – изучение энтеросорбентов в экспериментах с моделированием на животных различных заболеваний человека). Материалы статьи использованы при подготовке Методических рекомендаций Фармакологического центра МЗ Украины.

### Методы оценки физико-химических свойств энтеросорбентов

В табл. 1 приводится перечень методов оценки физико-химических свойств энтеросорбентов, за исключением собственно сорбционных. Сюда же внесены пункты, касающиеся химического состава энтеросорбентов и их химической чистоты.

**Таблица 1.** Методы изучения физико-химических свойств адсорбентов

№	Исследуемый показатель	Метод исследования
1	химический состав	Согласно проекту аналитической нормативной документации (АНД)
2	химическая чистота	согласно ГФУ 1 (2.4) [6], проекту АНД
3	потеря в массе при высушивании	согласно ГФУ 1, доп. 2 (2.2.32) [7]
4	зольность	согласно ГФУ 1 (2.4.14 или 2.4.16) [6]
5	насыпная плотность	согласно ГФУ 1 (2.9.15) [6]
6	растворимость в воде, спирте 96 %, других растворителях	согласно ГФУ 1 (1.4) [6]
7	вещества, растворимые в хлористоводородной кислоте	согласно проекту АНД
8	набухание в воде	определение степени набухания гравиметрическим способом
9	рН водной вытяжки	потенциометрический метод, по ГФУ 1, доп.2 (2.2.3) [7]
10	размер частиц	а) ситовый анализ по ГФУ 1 (2.9.12) [6] или ГФУ 1, доп.2 (2.9.38) [7]; б) микроскопия по ГФУ 1 (2.9.13) [6] или ГФУ 1, доп.2 (2.9.37) [7]; в) лазерная корреляционная спектроскопия
11	удельная поверхность	низкотемпературная десорбция азота или аргона по БЭТ согласно ГФУ 1., доп.2 (2.9.26) [7] или по ГОСТу 23401-78 [8]
12	пористость	а) эксикаторный метод по насыщению бензолом; б) ртутная порометрия
13	стабильность физико-химических свойств	соответствующим методом определяют физико-химические показатели, а также адсорбционную активность по отношению к выбранным маркерным веществам через 1 и 2 года хранения

Определение *химического состава* является обязательным, так как эти данные входят в АНД. Для определения состава используют подходящие физико-химические методы, включая масс-спектропию, рентген-флюоресцентный анализ, соответствующие

количественные химические методы. Целью определения состава энтеросорбентов является прежде всего получение информации о содержании в нем вещества (веществ) – носителя сорбционных свойств. Особенно важно определять элементный химический состав для природных сорбентов, представляющих, например, смесь минералов. Обязательным является определение количества ингредиентов в комбинированных препаратах. Желателен контроль содержания связующих и модификаторов вкуса и запаха, если таковые имеются.

*Химическая чистота* является важной характеристикой энтеросорбента, определяющей его качество как готового лекарственного средства. Испытание на чистоту желательно на стадии доклинического изучения и обязательно при регистрации энтеросорбента, поскольку этот тест входит в проект АНД. Неорганические примеси определяют в фильтрате или супернатанте, полученном после перемешивания энтеросорбента с водой, хлористоводородной кислотой, другими растворителями, с последующим отделением сорбента фильтрованием или центрифугированием. Тяжелых металлов должно быть не более 0,001%; железа – не более 0,06%; мышьяка – не более 0,0001%; цианиды – отсутствуют; нормы других примесей (хлориды, сульфиты, сульфаты и т.д.) устанавливает разработчик. Альтернативным методом является озонирование препарата с последующим анализом компонентов золы. Следует иметь в виду, что для лекарственных препаратов и пищевых добавок озонирование принято проводить при различных температурах ( $600 \pm 25^\circ\text{C}$  и  $350^\circ\text{C}$  соответственно), что может привести к различиям в конечном результате. Для некоторых сорбентов, например углеродных и кремнийсодержащих, температура озонирования может быть выше. Общий контроль органических неспецифических примесей осуществляют по массе остатка, образовавшегося после высушивания отфильтрованного 96% спирта, определенный объем которого кипятят с навеской сорбента (как прототип можно использовать тест, приведенный в ГФУ 1, доп. 2, С. 394 [7]). Например, для угольных сорбентов содержание веществ, растворимых в спирте, должно быть не более 0,5%, для микрокристаллической целлюлозы – не более 0,05%.

*Потеря в массе при высушивании* характеризует содержание как физически связанной воды (влажность), так и остаточных растворителей, которые могут использоваться при производстве энтеросорбента.

*Зольность* определяют путем прокаливании сорбента при температуре  $350^\circ\text{C}$  (если энтеросорбент относится к пищевым добавкам) и  $600^\circ\text{C}$  и выше (если энтеросорбент предполагается регистрировать как лекарственный препарат). Этот тест может рассматриваться как самостоятельный, характеризующий несжигаемый остаток энтеросорбента (актуально для углеродных и органических сорбентов), либо как промежуточный этап при определении наличия тяжелых металлов и других вредных примесей.

*Насыпную плотность* для энтеросорбентов в виде порошка или гранул определяют до и после усадки, как описано в ГФУ 1 [6].

*Растворимость* энтеросорбентов в воде, спирте 96% и других растворителях, если они указаны разработчиком, характеризуют в соответствии с критериями, приведенными в ГФУ 1 (1.4) [6].

*Определение веществ, растворимых в хлористоводородной кислоте*, является значимым тестом для энтеросорбентов, поскольку эта кислота присутствует в желудке. Для испытания выбирают один из методических подходов: 1) при кипячении в 0,1 М растворе HCl сорбент не должен терять массу в большей степени, чем на определенную заданную величину; 2) устанавливают норму массы остатка, который образуется при высушивании фильтрата после обработки сорбента разбавленными азотной и хлористоводородной кислотами (для углеродных энтеросорбентов в качестве прототипа можно использовать тест, приведенный в ГФУ 1, доп. 2, с.394 [7]). Содержание веществ,

растворимых в хлористоводородной кислоте, должно быть не более 3–4% для энтеросорбентов, полученных из натурального углеродсодержащего сырья, и не более 1% – для энтеросорбентов, полученных путем карбонизации синтетических матриц.

*Набухание в воде.* Для ограниченно набухающих энтеросорбентов степень набухания определяют как отношение прироста массы образца к исходной массе после выдерживания в воде в течение времени, достаточного для завершения процесса набухания. Для выполнения теста используют любую методику, применимость которой доказана разработчиком.

*pH водной вытяжки* может быть отнесен к критериям чистоты, поскольку кислотные или щелочные примеси могут влиять на pH желудочного содержимого. Испытание проводят потенциометрически или нормируют объем кислоты (щелочи), необходимый для изменения цвета соответствующего индикатора. Испытанию подвергают 4–5% суспензию (раствор) энтеросорбента или фильтрат (для гранул и волокнистых сорбентов). Перед фильтрованием допускается кипячение с обратным холодильником. Показатель pH должен быть не менее 3,5 и не более 9,0.

*Размер частиц.* Метод определения выбирают в зависимости от дисперсности энтеросорбента: 1) ситовый анализ – для грубых порошков и гранул с размером частиц более 40 мкм (допускается просеивание «мокрым» способом); 2) микроскопический метод либо электрометрический метод по типу Coulter-Counter – для частиц размером 1 мкм и более; 3) лазерная корреляционная спектроскопия (или иной физический метод, применимость которого должен обосновать разработчик) – для наноразмерных сорбентов, образующих водные взвеси.

*Удельная поверхность.* Обычно определяется по азоту методом БЭТ. Перед проведением испытания навеску энтеросорбента отмывают от растворимых примесей (если это необходимо) и высушивают до постоянного веса при температуре 105–110°C. Тест не проводят для растворимых в воде и жидких энтеросорбентов.

*Пористость.* Предельный объем пор определяют по величине адсорбции бензола в условиях равновесия. Высушенный до постоянного веса образец энтеросорбента помещают при 20°C над открытым сосудом с бензолом в эксикатор, предварительно заполненный парами бензола. Через 24 ч образец взвешивают, определяя прирост массы. Предельный объем пор для углеродных энтеросорбентов должен быть не менее 0,50 см<sup>3</sup>/г. Распределение пор по радиусам изучается методом азотной и ртутной порометрии. Эти тесты обычно не проводят для непористых препаратов (аэросилы, глины, пищевые волокна, набухающие полимеры и др.).

## Методы изучения адсорбционных свойств

Следует иметь в виду, что не существует прямой связи между адсорбционной активностью энтеросорбентов различных типов *in vitro* и их лечебной эффективностью в опытах *in vivo* с моделями патологических состояний и, тем более, в клинике. Поэтому результаты стендовых испытаний следует использовать в большей степени для сравнения поглотительной активности разрабатываемого сорбента и известных аналогов.

Простейшим методом сравнительной оценки поглотительных свойств энтеросорбентов является *метод точечных измерений*, заключающийся в том, что навески сорбционных материалов приводятся в контакт с растворами, имеющими стандартную концентрацию сорбируемого вещества, а затем после 4 ч встряхивания на шуттеле при постоянной температуре и осаждения сорбента центрифугированием определяют остаточную концентрацию адсорбата ( $C_{ocm}$ ). Зная исходную концентрацию  $C_o$ , объем раствора  $V$  и массу навески  $m$ , рассчитывают количество поглощенного вещества на единицу массы (объема) сорбента – величину адсорбции  $A$ , мг/г:

$$A = \frac{(C_o - C_{ocm}) * V}{m}$$

Метод точечных измерений является быстрым и удобным. Его недостаток заключается в том, что в отличие от метода построения изотерм (см. ниже) расчет емкостей сравниваемых энтеросорбентов происходит при различных остаточных концентрациях. Это приводит к занижению емкости более активных поглотителей по отношению к менее активным. Для нивелирования указанного недостатка рекомендуется использование поправочного коэффициента, когда величину адсорбции более мощного сорбента, т.е. давшего меньшую остаточную концентрацию адсорбата, умножается на частное от деления самой высокой остаточной концентрации на остальные, более низкие остаточные концентрации:

$$C_{ocm(max)} / C_{ocm(n)},$$

где  $n$  – номер сорбента, сравниваемого с сорбентом, давшим  $C_{max}$ . Этот прием основан на предположении, что в промежутке равновесных концентраций ( $C_{min}$ ,  $C_n$ ) изотерма адсорбции вещества « $n$ » имеет линейный характер.

При необходимости точечные измерения емкости энтеросорбентов могут проводиться при двух рН, соответствующих рН желудочного сока (1,5–2,5) и рН кишечного содержимого (7,0–8,0). Если остаточная концентрация адсорбата при использовании одного или нескольких сорбентов приближается к нулю, навеску (навески) следует уменьшить с тем, чтобы остаточная концентрация адсорбата составляла не менее 30% от исходной.

Другой количественный показатель, получаемый с помощью метода точечных измерений, который можно использовать для сравнения энтеросорбентов – это константа связывания, характеризующая сродство сорбента к выбранному адсорбату. Константу связывания определяют как отношение  $K=A/C_{ocm}$  (выражается в мл/г или л/г). Если емкость сорбента является «геометрическим» параметром, прямо зависящим от величины его активной поверхности, то константу связывания следует рассматривать как «термодинамический» параметр, характеризующий прочность фиксации молекул адсорбата на поверхности сорбента. Чем больше значение  $K$ , тем «активнее» изучаемый сорбент в отношении данного адсорбата.

Метод точечной оценки позволяет в скрининговом режиме сравнивать по нескольким показателям большое количество различных энтеросорбентов, либо большое количество вариантов одного и того же энтеросорбента, например ряд углеродных материалов, полученных при различных режимах активации. Когда число вариантов сведено до минимума, т.е. до 1–2 образцов, например разрабатываемый энтеросорбент и энтеросорбент сравнения, переходят к более точным методам анализа сорбционной активности препарата, а именно, к изучению кинетических кривых и изотерм адсорбции. Первый вид анализа изучает временную динамику поглотительных свойств сорбента и определяет время достижения равновесной концентрации, второй – дает зависимость величины адсорбции на единицу массы поглотителя от равновесной концентрации адсорбата.

*Построение кинетической кривой.* Ряд одинаковых навесок сорбента перемешивают с раствором адсорбата в течение фиксированных промежутков времени (для пористых сорбентов рекомендуется 5, 15, 30, 60 мин и 2, 4, 6, 12 и 24 и 48 ч; для непористых сорбентов временной диапазон может быть сокращен). После этого сорбент отделяют фильтрованием или на центрифуге и в супернатанте определяют остаточную концентрацию адсорбата. Полученную временную зависимость изображают графически. Соотношение количества сорбента и объема раствора адсорбата подбирают эмпирически (для угольных сорбентов обычно 20–60 мг на 10 мл).

*Построение изотермы адсорбции.* Ряд одинаковых навесок сорбента перемешивают с растворами адсорбата с нарастающей концентрацией в течение времени, достаточного для установления адсорбционного равновесия (определяют по кинетической кривой). После удаления сорбента для каждого образца определяют равновесную концентрацию  $C_p$ . Величины адсорбции  $A$ , мг/г, рассчитывают как в методе точечных измерений, принимая  $C_{ocm} = C_p$ . Результаты измерений выражают в виде изотермы адсорбции – графика зависимости  $A$  от  $C_p$ , для построения которого необходимо не менее 6 (оптимально 10) экспериментальных точек. Из графика приблизительно определяют величину предельной адсорбции  $A_{max}$ , после которой увеличение равновесной концентрации уже не дает прироста величины адсорбции (начало «плато» изотермы).

### **Вещества, используемые для характеристики поглотительных свойств энтеросорбентов**

В табл. 2 приведен примерный перечень веществ, используемых для характеристики энтеросорбентов; условно она может быть разделена на 3 части. В первой части обычно присутствует 3 красителя, один из которых является катионным (метиленовый синий), второй – анионным (конго красный) и третий – нейтральным в интервале физиологических значений pH (феноловый красный). Эти красители близки по молекулярной массе, в связи с чем значительные различия в их адсорбции могут свидетельствовать об электростатической составляющей поглощения, присущей изучаемому энтеросорбенту. Во второй части табл. 2 содержится 6 веществ, хотя их список может быть продолжен. Креатинин здесь является, с одной стороны, представителем азотистых шлаков, а, с другой, – маркером веществ малой молекулярной массы, свободно растворимых в воде. Витамин B<sub>12</sub> традиционно представляет вещества средней молекулярной массы (500–1500 Да). Неконъюгированный билирубин, с одной стороны, также относится к веществам средней молекулярной массы, с другой, является одним из маркеров печеночной недостаточности и, наконец, представляет группу соединений, прочно связанных ( $K_{acc} \approx 10^8 \text{ мол}^{-1}$ ) с сывороточным альбумином. Человеческий сывороточный альбумин является маркером адсорбции высокомолекулярных соединений и, одновременно, важнейшим белком-носителем гидрофобных лигандов. Адсорбция билирубина и альбумина измеряется из их смеси, причем важным является определение изменений их молярного коэффициента  $k = C_1/C_2$ , т. е. отношения молярных концентраций лиганда и носителя до и после контакта с энтеросорбентом. Желатин является продуктом гидролиза коллагена и может служить маркером крупномолекулярных белков, не имеющих регулярной структуры.

Особое значение имеет изучение адсорбции бактериального эндотоксина (бактериального липополисахарида, БЛПС), играющей большую роль в реализации дистантных (системных) эффектов энтеросорбции. Бактериальные эндотоксины являются облигатным структурным компонентом наружной мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Макромолекула БЛПС представляет собой полисахарид-белок-липидный комплекс с молекулярной массой от  $4 \cdot 10^5$  до  $4 \cdot 10^6$  Да. БЛПС включает 3 ковалентно-связанных компонента: гидрофобную липидную часть (липид А), сердцевинную область (гидрофильный (о)-полисахарид) и О-специфическую боковую цепь. В состав R-сердцевинной зоны входит трисахарид, состоящий из трех остатков 2-кето-3-дезоксоктоновой кислоты (КДО), методика определения которой лежит в основе количественного спектрофотометрического анализа БЛПС в растворах и биологических жидкостях [10]. Адсорбция БЛПС *E. coli* 0111:B4 («Sigma», США) обычно изучается в шуттельных экспериментах из натрий-фосфатного буферного раствора (pH 7,2), содержащего 0,5 мг БЛПС в 1 мл. Столь высокая концентрация БЛПС связана с тем, что

средой действия энтеросорбентов является не кровь, а кишечное содержимое, в котором присутствует огромное количество кишечной палочки. Объем раствора сорбата составляет 3 мл, время адсорбции – 4 ч. Навески сорбентов смачивают 0,1 мл буферного раствора и оставляют на 12–24 ч. Величину адсорбции определяют по снижению содержания БЛПС в растворе и рассчитывают на 1 г массы сорбента.

**Таблица 2.** Тест-вещества, используемые для изучения сорбционных свойств

№	Вещество, молекулярная масса (Да)	Метод определения остаточной концентрации сорбата
<i>I. Разнозаряженные красители</i>		
1	метиленовый синий (374 Да)	измерение оптической плотности раствора при $\lambda=670$ нм
2	конго красный (697 Да)	– « – при $\lambda=490$ нм
3	феноловый красный (376 Да)	– « – при $\lambda=430$ нм
<i>II. Маркеры биологической активности</i>		
4	креатинин ( 113 Да)	– « – при $\lambda=234$ нм
5	витамин В <sub>12</sub> (1355 Да)	– « – при $\lambda=548$ нм
6	неконъюгированный билирубин (585 Да) в 3% растворе сывороточного альбумина человека	метод Эндрассика–Грофа [9]
7	сывороточный альбумин человека (67 кДа)	унифицированный метод по реакции с бромкрезоловым зеленым [9]
8	желатин ( $\approx 350$ кДа)	биуретовый метод, измерение оптической плотности раствора при $\lambda=560$ нм
9	липополисахарид бактериальной стенки кишечной палочки (ЛПС, бактериальный эндотоксин) (400–4000 кДа)	метод спектрофотометрии [10]
<i>III. Лекарственные вещества и ксенобиотики</i>		
10	феназон (антипирин) (188 Да)	метод броматометрии по ГФУ 1, доп. 2, с.395 [9]
11	изониазид (137 Да)	измерение оптической плотности раствора при $\lambda=260$ нм
12	рифампицин (823 Да)	– « – при $\lambda=334$ нм
13	барбитураты (натрия барбитал, 206 Да)	– « – при $\lambda=240$ нм (рН 9,4)
14	фенол (94 Да)	по реакции с гексацианоферратом калия (III) и 4-аминоантипирином [11] с фотометрированием при $\lambda=490$ нм или прямым измерением оптической плотности раствора при $\lambda=269$ нм
15	свинец	атомно-абсорбционный или эмиссионный спектральный анализ по ГФУ 1 (2.2.22; 2.2.23) [6]
16	цезий	– « –

Метод определения БЛПС включает гидролиз БЛПС серной кислотой (0,25 н) при температуре 100°C, в процессе которого от молекулярного комплекса БЛПС отщепляется

КДО. На следующем этапе КДО окисляется периодатом калия (0,025 М раствор в 0,125 н серной кислоте). После остановки реакции с помощью арсенита натрия (2% раствор в 0,5 н хлористоводородной кислоте) образующиеся продукты окисления дают в реакции с тиобарбитуровой кислотой (0,3% водный раствор) красный хромофор, оптическая плотность которого определяется при 532 нм.

Изменение концентрации БЛПС после контакта с энтеросорбентом может быть оценено также при помощи ЛАЛ-теста по ГФУ 1 [6] либо в биологических тестах на мышах с блокированием ретикулоэндотелия [12]. Кроме БЛПС, может быть изучена адсорбция других бактериальных токсинов, например эндотоксина шигеллы Бойди, ботулинического эндотоксина, стафилококкового эндотоксина [13] и т. д.

Изучение сорбции лекарственных веществ и ксенобиотиков (3-я часть табл. 2) важно, с одной стороны, для оценки исследуемого энтеросорбента как потенциального средства лечения острых отравлений, передозировок и профзаболеваний, а, с другой стороны, для решения вопроса о пригодности (удобстве) применения этого энтеросорбента в параллели проводимому длительному и интенсивному курсу пероральной лекарственной терапии, например при ВИЧ-инфекции, туберкулезе, ревматоидном артрите. В этом смысле особенно интересен кремнийорганический препарат энтеросгель, который, обладая полезными системными свойствами энтеросорбентов, в то же время практически не поглощает большинство лекарственных препаратов.

В третьей части табл. 2 феназон (антипирин) приведен как тестовая молекула, используемая в настоящее время для оценки емкости медицинских активированных углей, изониазид и (или) рифампицин – в качестве примера лекарственных веществ, адсорбция которых желательна при передозировке, но нежелательна при использовании энтеросорбентов для лечения ятрогенной интоксикации, вызванной продолжительным курсом противотуберкулезной терапии. Естественно, что в подобных случаях следует применять различные сорбенты либо различные схемы их назначения. Натрия барбитал (мединал) присутствует в табл. 2 как пример из группы барбитуратов, довольно часто фигурирующих в качестве причины острых отравлений при попытках суицида. Фенол, свинец, цезий рассматриваются как ксенобиотики, представляющие разные группы экзогенных токсических веществ (органические яды, тяжелые металлы, радионуклиды).

Следует отметить, что табл. 2 могла бы быть продолжена описанием тестов по связыванию микроорганизмов, однако в связи со специфичностью этих тестов и невозможностью оценки патогенов в терминах молекулярных масс, гидрофильности, гидрофобности и т.д., этот материал вынесен в отдельную краткую рубрику.

*Связывание микроорганизмов энтеросорбентами* проводят обычно из суспензии бактериальных клеток (приблизительно  $10^9$  клеток/мл), к которой добавляют исследуемый материал, занимающий обычно около 20% объема суспензии. После этого полученную смесь встряхивают на шуттеле в течение 30 мин, затем осаждают сорбент путем отстаивания, мягкого центрифугирования или пропуска через фильтр, задерживающий частицы сорбента, но не задерживающий тестовый патоген, и высевают 0,1 мл фильтрата на мясо-пептонный агар, с учетом числа колоний через 24 ч. В качестве тестовых культур могут использоваться кишечная палочка, протей, *C. albicans*, *St. aureus*, эпидермальный стрептококк и т.д.

Специальные вирусологические методы применяются для оценки связывания энтеросорбентом вирусных частиц и прежде всего ротавирусов [14].

### **Оценка каталитических свойств сорбентов**

Данное испытание имеет отношение в основном к активированным углям. При этом может оцениваться каталазная активность энтеросорбентов и амилолитическая активность в отношении раствора крахмала.



Ферментоподобную каталазную активность углеродных сорбентов исследуют в реакции разложения субстрата путем определения константы Михаэлиса–Ментен ( $K_m$ ) [15]: чем меньше ее значение, тем выше ферментативная активность сорбента. Для определения каталазной активности углеродных сорбентов путем расчета константы Михаэлиса–Ментен обычно исследуют реакцию разложения перекиси водорода в ряду растворов с концентрацией 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8%  $H_2O_2$ .

Для скрининговых исследований можно оценивать каталазную активность сорбентов по уменьшению содержания  $H_2O_2$  в растворе с одной выбранной концентрацией перекиси водорода. Опыты проводят при значениях pH 6,8. Объем раствора перекиси водорода – 50 мл, навеска сорбента – 0,1 г. Содержание перекиси водорода в реакционной среде определяют методом перманганатометрии [16]: пробу объемом 1 мл переносят в колбу, добавляют 10 мл воды и 1 мл  $H_2SO_4$  (1:4) и титруют раствором  $KMnO_4$  до появления розового окрашивания, которое не изменяется в течение 1 мин. Концентрацию  $H_2O_2$  рассчитывают по формуле:

$$C_{H_2O_2} = \frac{C_1 V_1}{V_2},$$

где  $C_1$  – концентрация раствора  $KMnO_4$ , г-экв/л;  $V_1$  и  $V_2$  – объем раствора  $KMnO_4$ , израсходованный на титрование, и объем аликвоты, соответственно, мл.

Для оценки амилолитической активности согласно методике [17] готовят основной раствор йода, содержащий 2,5 г йода и 25 г калия йодида в 1 л воды. Для приготовления рабочего раствора 20 мл основного раствора доводят 0,1 н раствором  $HCl$  до 1 л. 1 г углеродного сорбента перемешивают в течение эмпирически установленного интервала времени со 100 мл крахмального клейстера концентрацией 0,4 – 1,2 %. После удаления сорбента к 0,5 мл раствора крахмала прибавляют 50 мл рабочего раствора йода, выдерживают 20 мин. Степень гидролиза крахмала оценивают по убыли оптической плотности синего иод-крахмального комплекса при длине волны 670 нм в сравнении с контрольным раствором (не подвергавшимся воздействию сорбента).

## Література

1. Николаев В.Г., Стрелко В.В., Коровин Ю.Ф. Теоретические основы и практическое применение метода энтеросорбции // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в медицине. – Харьков: 1982. – С. 112–114.
2. Nikolaev V.G. Enterosorption // Proc. of the Fifth Int. Symp. on Hemoperfusion and Artificial Organs / Ed. by T. M. S. Chang, H. Bing-Lin. Tianjin: China Academic Publishers, 1984. – P. 87–99.
3. Энтеросорбция в комплексном лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости / Под ред. А.А.Вильцанюка, И.И.Герашенко. – Харьков: Альфа-ПК, 2009. – 128 с.
4. Гурина Н.М., Бардахівська К.І. Энтеросорбенти як засіб детоксикації організму // Довкілля та здоров'я. – 2007. – Т. 42, № 3. – С. 64–66.
5. Николаев В.Г., Михаловский С.В., Гурина Н.М., Мартынов А.К. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 4. – С. 3–17.
6. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1 вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
7. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-вид., Доп. 2. – Харків: РІРЕГ, 2008. – 620 с.
8. ГОСТ 23401–78. Определение удельной поверхности.
9. Лабораторные методы исследования в клинике. / Под ред. В.В.Меньшикова. – Москва: Медицина, 1987. – 368 с.

10. Cynkin M., Ashwell G. Estimation of 3-deoxy sugar by means of the malonaldehyde thiobarbituric acid reaction // Nature. – 1960. – V. 186. – P. 155–156.
11. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – Москва: Химия, 1975. – 359 с.
12. Киселев П.Н., Шульс Г.С. Определение содержания бактериальных эндотоксинов в крови животных и людей, подвергнутых облучению // Лаборатор. дело. – 1981. – № 9. – С. 561–563.
13. Howell C.A., Sandeman S., Phillips G.J. Activated carbon adsorbents for extracorporeal removal of biological toxin and inflammatory cytokines // Biodefence: advanced materials and methods for health protection: Book of abstracts. – Tashkent–Samarkand, 2009. – P. 61.
14. Барбова А.И. Сорбция ротавирусов человека и животных энтеросорбентом // Микробиолог. журн. – 1995. – Т. 57, № 5. – С. 52–56.
15. Практикум по биохимии. / Под ред. Н.П. Мешкова, С.Е. Северина – Москва: Изд-во Моск. Ун-та, 1979. – 216 с.
16. Бабко А.К., Пятницкий И.В. Количественный анализ. – Москва: Высш. шк., 1968. – 496 с.
17. Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. – Москва: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 240 с.

#### **ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЕНТЕРОСОРБЕНТІВ: ХІМІКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ АСПЕКТ**

**В.Г. Ніколаєв<sup>1</sup>, І.І. Геращенко<sup>2</sup>, М.Т. Картель<sup>2</sup>, Н.М. Гуріна<sup>1</sup>,  
О.М. Бакалінська<sup>2</sup>, В.В. Сарнацька<sup>1</sup>, Є.А. Снежкова<sup>1</sup>, К.І. Бардахівська<sup>1</sup>,  
Л.О. Сахно<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
Національної академії наук України  
вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна*

<sup>2</sup>*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова 17, Київ, 03164, Україна*

*У статті розглянуто методологію оцінки фізико-хімічних, у тому числі адсорбційних і каталітичних, властивостей ентеросорбентів, їхнього складу та потенціальної біологічної активності, що є першим етапом доклінічного вивчення препаратів цієї групи. Матеріали статті стали основою для Глави 1 Методичних рекомендацій Державного експертного центру МОЗ України.*

#### **PRE-CLINICAL EXAMINATION OF ENTEROSORBENTS: CHEMOPHARMACENTIC ASPECT**

**V.G. Nikolaev<sup>1</sup>, I.I. Gerashchenko<sup>2</sup>, N.T. Kartel<sup>2</sup>, N.M. Gurina<sup>1</sup>,  
O.N. Bakalinskaya<sup>2</sup>, V.V. Sarnatskaya<sup>1</sup>, E.A. Snezhkova<sup>1</sup>, K.I. Bardakhivskaya<sup>1</sup>,  
L.A. Sakhno<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology  
of National Academy of Sciences of Ukraine  
45 Vasilkovskaya Str., Kiev, 03022, Ukraine,*

<sup>2</sup>*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Str., Kiev, 03164, Ukraine*

*The methodology is considered of evaluation of physico-chemical properties of enterosorbents including their adsorptive and catalytic properties, content and potential biological activity. The materials of this paper were used in Chapter 1 of Methodical Recommendations prepared by the State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine.*