

Статья публикуется по материалам доклада на Научно-практической конференции “Новые химико-фармацевтические технологии”, состоявшейся 28 мая 2014 г. в РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Публикация доступна для обсуждения в рамках функционирования постоянно действующей интернет-конференции “Бутлеровские чтения”. <http://butlerov.com/readings/>

Поступила в редакцию 18 июля 2014 г. УДК 615.243.

Противоязвенный препарат на основе субстанции висмута(III) калия дицитрата

© Юхин^{1*} Юрий Михайлович, Найдено¹ Екатерина Сергеевна,
Карпова² Евгения Михайловна, Фрумин² Леонид Ерухимович,
Савельева² Кристина Романовна, Хлябич² Георгий Николаевич
и Шестаков² Владислав Николаевич

¹ Институт химии твёрдого тела и механохимии СО РАН. Ул. Кутателадзе, 18.
г. Новосибирск, 630128. Россия. E-mail: yukhin@solid.nsc.ru

² Федеральное бюджетное учреждение «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик». Лавров пер., 6. г. Москва, 109044. Россия.

*Ведущий направление; †Поддерживающий переписку

Ключевые слова: висмута трикалия дицитрат, язвенная болезнь, *Helicobacter pylori*, доклинические исследования.

Аннотация

Методами рентгенофазового и химического анализов исследовано взаимодействие цитрата висмута(III) состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ с водными растворами гидроксида калия и аммония различной концентрации. Установлено, что коллоидный субцитрат висмута, используемый в качестве лекарственной субстанции в противоязвенных препаратах, представляет собой висмут-калий-аммоний цитрат. Показана целесообразность получения висмут-калий-аммоний цитрата для противоязвенного средства типа «Де-Нол» (Нидерланды) путем получения цитрата висмута высокой чистоты по реакции взаимодействия тригидрата нитрата оксогидроксовисмута с растворами лимонной кислоты, растворением полученного цитрата в водном растворе гидроксида калия в присутствии гидроксида аммония с последующей кристаллизацией продукта упариванием или распылительной сушкой. Проведены доклинические исследования по изучению общетоксического и местного раздражающего действия препарата висмута трикалия дицитрата при курсовом внутриведении, сделан вывод о безопасности изученного препарата.

Введение

Язвенная болезнь желудка – одно из самых распространённых заболеваний. Среди людей старше 40 лет ею страдают более 10% населения. Лечение болезни носит затяжной характер и зачастую требует хирургического вмешательства. Экономический ущерб от потери трудоспособности при этой болезни весьма значителен. Поэтому разработка препаратов, позволяющих снизить заболеваемость и сократить продолжительность нетрудоспособности, очень актуальна.

В начале 80-х годов прошлого века было установлено, что среди причин, вызывающих язвенную болезнь, одной из ведущих является инфицирование слизистой оболочки желудка бактериями *Helicobacter pylori*. Одним из первых обладающих антибактериальным эффектом препаратов, которые начали использовать для лечения *Helicobacter Pylori* инфекции, стал «Де-Нол», выпускаемый фирмой *Yamanouchi Europe* (Нидерланды).

Данный препарат, согласно мнению гастроэнтерологов, относится к числу наиболее эффективных противоязвенных препаратов и должен присутствовать в комплексной терапии практически каждого больного язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки [1-4]. Препарат выгодно отличается от других солей висмута тем, что обладает способностью растворяться в желудочной слизи, что позволяет ему проникать к *Helicobacter Pylori*, которые находятся под ее слоем. Растворимость коллоидного субцитрата висмута в 20-100 раз выше по

сравнению с другими висмутсодержащими препаратами [5]. Оптимальная растворимость его в желудочном соке имеет место при pH 4-7.

Фармакологически активной частью препарата является висмута трикалия дицитрат (коллоидный субцитрат висмута), который представляет собой высушенный коллоидный комплекс основного цитрата калия и основного цитрата аммония в аммиачном растворе с эмпирической формулой $[\text{Bi}_6(\text{OH})_6(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_4]_n$. Следует отметить, что в Государственном Реестре Лекарственных средств формула данной субстанции приведена в виде $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BiK}_3\text{O}_{14}$, что соответствует названию – висмута трикалия дицитрат [6].

Коллоидный субцитрат висмута получают обычно из цитрата висмута [7-9]. Известны способы получения коллоидного субцитрата висмута из среднего нитрата [10, 11] или металлического висмута [12], но они также проходят через стадию синтеза цитрата висмута. Для получения коллоидного субцитрата висмута цитрат висмута растворяют в водном растворе цитрата калия и аммония при pH раствора 8-9, который создают добавлением водного раствора аммиака с последующей распылительной сушкой при температуре 220-240 °С.

Настоящая работа посвящена определению состава коллоидного субцитрата висмута, сравнению способов его получения, а также изучению общетоксического и местного раздражающего действия этого препарата.

Экспериментальная часть

В работе использовали минеральные и карбоновые кислоты, соли и щелочи квалификации «хч» или «осч».

Содержание висмута в растворах и продуктах осаждения или обмена в зависимости от количеств определяли фотоколориметрическим (с использованием *ФЭК-56ПМ*) или комплексометрическими методами. Осадки перед определением предварительно растворяли в азотной кислоте с концентрацией 6-8 моль/л. Фотоколориметрическое определение микроколичеств висмута основано на образовании в избытке иодида калия комплексного соединения $\text{K}[\text{BiI}_4]$, окрашивающего растворы в желтый цвет. Макроколичества висмута в растворе определяли титрованием раствором комплексона (III) с использованием ксиленового оранжевого в качестве индикатора.

Анализ примесных металлов осуществляли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре *Varian AA 280FS* (Австралия) или атомно-эмиссионным спектральным методом на спектрометре *САР-6500 (Termo Scientific)*.

Концентрацию нитрат-ионов определяли методом фотоколориметрии с салицилатом натрия, содержание цитрат-ионов определяли методом перманганатометрического титрования.

Измерение значений pH растворов осуществляли на pH-метре *ОР-264/1* (Венгрия) с помощью стеклянного или обновляемого твердого электрода.

Рентгенофазовый анализ (РФА) исходных образцов и продуктов реакций проводили на дифрактометре ДРОН-3 с использованием CuK_α -излучения со скоростью вращения счетчика 0.5 град/мин и $I = 1000$ и порошковом дифрактометре *Bruker* (CuK_α -излучение, скорость вращения счетчика 0.1 град/мин).

Электронно-микроскопические снимки получали с использованием сканирующего электронного микроскопа *Hitachi TM 1000*.

Сравнительное исследование безопасности изучаемого препарата проведено с использованием физиологических, биохимических, гематологических и гистологических методов [13-16]. Изучена острая токсичность на нелинейных белых мышах при однократном внутрижелудочном введении, а также субхроническая токсичность и местное раздражающее действие на нелинейных крысах при курсовом внутрижелудочном введении в течение 14 дней [13, 17-19].

При изучении острой токсичности препараты вводили мышам однократно внутрижелудочно в дозах 2 300, 2 600 и 3 000 мг/кг (по активной субстанции).

Субхроническая токсичность и местное раздражающее действие изучены на крысах самцах при курсовом введении в течение 14 дней в дозе 200 мг/кг (по активной субстанции).

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования свидетельствуют, что молярное отношение ионов висмута к цитрат-ионам, ионам калия и аммония в субстанции препарата «Де-Нол» составляет соответственно 1.0 : 1.40 : 1.80 : 1.22. Исходя из этого состав субстанции может быть представлен

ПРОТИВОЯЗВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ СУБСТАНЦИИ ВИСМУТА(III) КАЛИЯ ДИЦИТРАТА __ 87-93 в следующем виде $[\text{Bi}_6(\text{OH})_6(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_4][\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_x[(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_y$, где $x = 3.2-4.2$; $a y = 0.8-1.8$ с содержанием активного компонента в пересчете на оксид висмута 38.5–42.0 %.

Исследование растворимости цитрата висмута состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ в воде показало, что концентрация висмута в растворе составляет 0.011 г/л. В случае висмут трикалия дицитрата состава $\text{BiK}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ она составляет 1.4 г/л, а в случае коллоидного субцитрата висмута – 400 г/л. Таким образом присутствие в субстанции цитратов калия и аммония способствует, при ее растворении в воде, образованию в растворе коллоидного субцитрата висмута.

Проведенные исследования взаимодействия цитрата висмута(III) состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ с водными растворами гидроксида калия при температурах (23 ± 2) и (70 ± 1) °C показали (рис. 1), что с ростом концентрации гидроксида калия зависимость $C_{\text{Вi}} - C_{\text{КОН}}$ проходит через максимум. Концентрация висмута в растворе достигает значения 61.0 г/л при концентрации КОН 0.6 моль/л, а при дальнейшем увеличении концентрации исходного раствора гидроксида калия имеет место резкое снижение содержания ионов висмута в растворе.

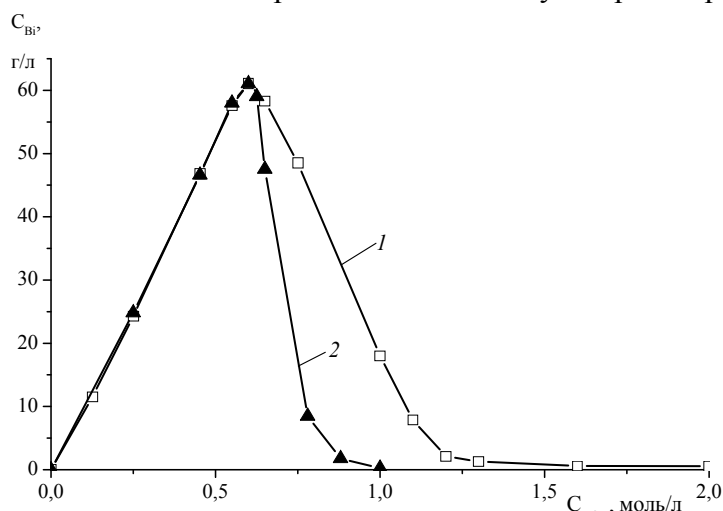


Рис. 1. Зависимость концентрации висмута в растворе от исходной концентрации гидроксида калия. Температура (°C): 1 – 23, 2 – 70.

Согласно данным рентгенофазового анализа, с увеличением концентрации гидроксида калия и, соответственно, с ростом концентрации ионов висмута в растворе интенсивности дифракционных максимумов со значениями d/n 9.12, 5.59, и 4.04 Å, характерными для соединения $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, снижаются. Их положение практически не изменяется, а на дифрактограммах при $C_{\text{КОН}} \geq 0.1$ моль/л отчетливо проявляется дополнительный максимум цитрата висмута-калия со значением d/n 8.50 Å, интенсивность которого с ростом концентрации раствора гидроксида калия увеличивается, а интенсивности дифракционных максимумов $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ снижаются.

При $C_{\text{КОН}} = 0.1-0.25$ моль/л на рентгенограммах соединений присутствуют дифракционные максимумы, соответствующие смеси цитрата висмута и висмут-калиевого цитрата. При увеличении концентрации раствора гидроксида калия более 0.25 моль/л продукт содержит (в %) К – 7.37 %, Вi – 41.99 %, Cit^{3-} (цитрат-ионы) – 35.0 %, H_2O – 4.0%. Молярное отношение цитрат-ионы : висмут : калий : вода в продукте равно 1 : 1 : 1 : 1, что соответствует составу $\text{KBiC}_6\text{H}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Увеличение концентрации раствора гидроксида калия > 0.7 моль/л приводит к снижению содержания висмута в растворе и аморфизации образовавшегося продукта.

При этом молярное отношение цитрат-ионов к висмуту в продукте реакции снижается и при концентрации раствора гидроксида калия, равной 0.75 моль/л при температуре процесса 70 °C, составляет 0.5. При дальнейшем увеличении концентрации $\text{KOH} \geq 1.0$ моль/л имеет место образование оксида висмута(III). Повышение температуры до 70 °C способствует тому, что образование оксида висмута наблюдается при более низких значениях концентраций гидроксида калия (≥ 1.0 моль/л).

Проведенные исследования взаимодействия цитрата висмута(III) с растворами гидроксида аммония при температурах (23 ± 2) и (50 ± 1) °C показали (рис. 2), что с увеличением концентрации гидроксида аммония до 2.4 моль/л количественный перевод висмута в раствор

возрастает до значений 210 и 260 г/л соответственно. При дальнейшем увеличении концентрации раствора гидроксида аммония до 3-6 моль/л происходит уменьшение концентрации ионов висмута в растворе до 100-120 г/л и последующее постепенное их возрастание до максимального значения ~360 г/л при исходной концентрации раствора гидроксида аммония 14 моль/л.

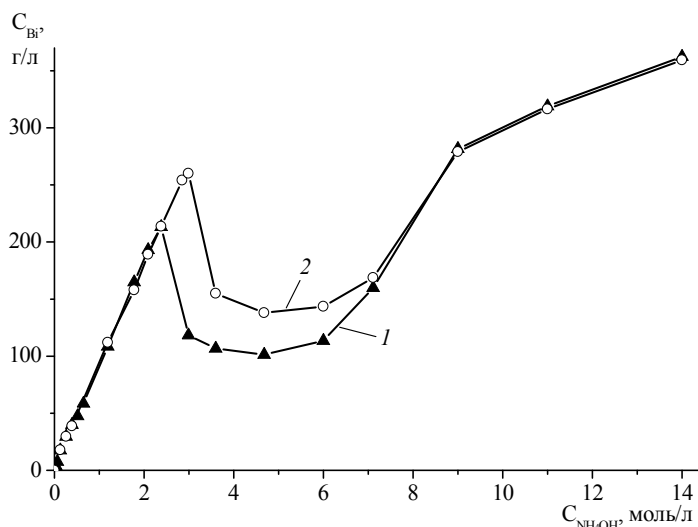


Рис. 2. Зависимость концентрации висмута в растворе от исходной концентрации гидроксида аммония. Температура (°C): 1 – 23, 2 – 50.

Согласно данным рентгенофазового анализа, при обработке цитрата висмута состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ растворами гидроксида аммония на восходящем участке зависимости $C_{\text{Bi}} - C_{\text{NH}_4\text{OH}}$ до значения концентрации гидроксида аммония ~1 моль/л на дифрактограммах наряду с дифракционными максимумами исходного цитрата висмута (d/n 9.12, 4.59, 4.04, 3.08, 2.10 Å) присутствуют также максимумы другого соединения. Данное соединение образуется в осадке в чистом виде в области максимума на кривой взаимодействия со значением концентрации висмута в растворе 210 и 260 г/л (при температурах 23 и 50 °C соответственно) и представляет собой цитрат висмута-аммония состава $(\text{NH}_4)\text{BiC}_6\text{H}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [20] с дифракционными максимумами d/n 9.56, 7.00, 5.13, 4.45, 3.15, 2.80, 1.97 Å.

Увеличение концентрации гидроксида аммония в системе выше 3 моль/л способствует образованию рентгеноаморфного соединения, что на кривой взаимодействия соответствует нисходящим ветвям. При дальнейшем увеличении концентрации гидроксида аммония данное соединение растворяется с получением растворов, содержащих 360 г/л висмута.

Таким образом, при обработке цитрата висмута водой и водными растворами гидроксидов калия и аммония концентрация висмута в растворе возрастает от 0.011 г/л до 61 г/л (KOH) и 360 г/л (NH_4OH), а при растворении висмут-калий-аммоний цитрата в воде могут быть получены растворы, содержащие до 400 г/л висмута. Растворы, полученные в результате обработки висмут-калий-аммоний цитрата в воде, с концентрацией висмута 250 г/л исследованы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Образцы снимали на просвет (длина волны составляла 1.516 Å). Обработка широкого пика показала, что его положение (3.82 град.) соответствует межчастичному расстоянию ~22 Å, а ширина пика (3.57 град.) соответствует размеру частиц ~2.2 нм. Разбавление раствора в четыре раза водой приводит к синхронному увеличению межчастичного расстояния и размеров до 26 Å.

В результате проведенных исследований показана целесообразность получения субстанции висмут-калий-аммоний цитрата для производства отечественного противоязвенного лекарственного средства Витридинол. Способ включает очистку висмута от сопутствующих металлов в результате его осаждения в виде оксогидроксонитрата состава $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{OH})_4](\text{NO}_3)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ с последующим переводом его в цитрат состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ по реакции взаимодействия с растворами лимонной кислоты, растворением полученного цитрата в водном растворе гидроксида калия в присутствии гидроксида аммония с последующей кристаллизацией продукта упариванием при (65 ± 5) °C или распылительной сушкой при 230 °C [12].

На рис. 3 приведены электронные микрофотографии продуктов, полученных в результате распылительной сушки раствора (а) и при его кристаллизации (б). Из рисунка видно, что в первом случае продукт представляет собой обломки полых сфероподобных кристаллов диаметром от 3 до 100 мкм. В свою очередь продукт, полученный в результате кристаллизации раствора упариванием, представляет собой агрегаты от 5 до 50 мкм, состоящие из удлиненных призматических кристаллов длиной до 10 мкм и по толщине порядка 2 мкм, а также пластинчатых кристаллов размером 1x1 и 5x5 мкм, а по толщине ~0.1 мкм. Следует отметить, что продукт, полученный кристаллизацией раствора хорошо таблетруется с использованием воды, в то время как продукт, полученный в результате распылительной сушки, при этом карамелизуется и требует использования на стадии таблетирования метилового спирта.

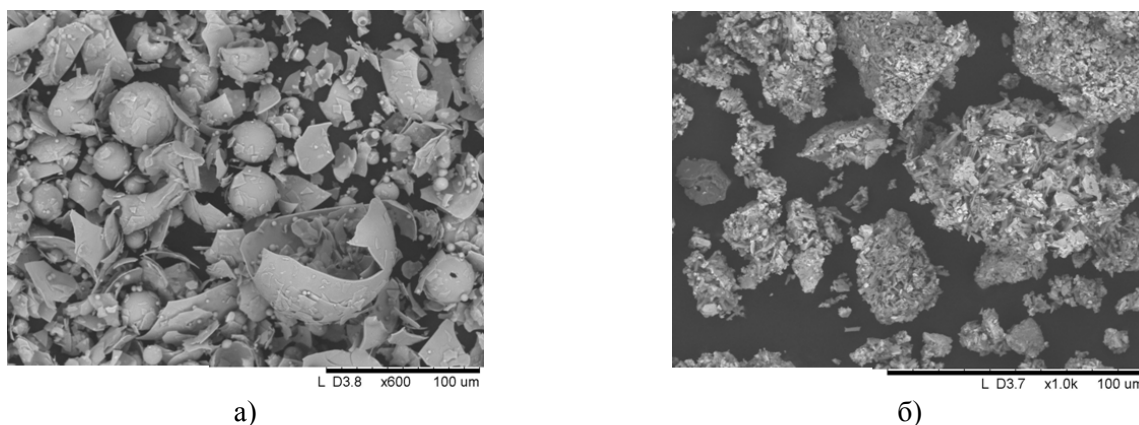


Рис. 3. Электронно-микроскопические снимки висмут-калий-аммоний цитрата, полученного из раствора: кристаллизацией (а) и распылительной сушкой (б)

Укрупненные лабораторные испытания проведены на примере переработки 50 кг металлического висмута марки Ви1, содержащего (в %): висмута – 98.5; свинца – 0.88; меди – $9.5 \cdot 10^{-3}$; серебра – $5.6 \cdot 10^{-2}$; железа – $6.2 \cdot 10^{-3}$; цинка – $6.4 \cdot 10^{-4}$; кадмия – $3.0 \cdot 10^{-3}$.

Металлический висмут предварительно окисляли кислородом воздуха при перемешивании его расплава при температуре 600 °С, полученный оксид висмута обрабатывали при перемешивании раствором азотной кислоты с концентрацией 6 моль/л, а полученный раствор с концентрацией висмута 400 г/л перерабатывали по схеме, приведенной в работе [12].

В результате переработки висмутсодержащего раствора получен висмут-калий-аммоний цитрат, который представляет собой кристаллический порошок белого цвета, растворимый в дистиллированной воде с рН 6.6. Потеря в массе при высушивании составляет 5.7%, а содержание оксида висмута, калия и цитрата в пересчете на сухое вещество составляет соответственно (в %): 39.6; 12.5 и 43.5. Содержание примесных металлов (в %): меди – 0.0001; свинца – 0.0004; серебра – 0.0001; мышьяка – $< 5 \cdot 10^{-4}$; кадмия – $< 3 \cdot 10^{-5}$; железа – $< 3 \cdot 10^{-5}$; марганца – $< 5 \cdot 10^{-6}$; никеля – $< 5 \cdot 10^{-5}$; сурьмы – $< 1 \cdot 10^{-4}$; цинка – $< 4 \cdot 10^{-5}$.

В результате проведенных доклинических исследований показано, что при однократном внутрижелудочном введении мышам изучаемого препарата по сравнению с контрольной группой, не получавшей препарат, величины LD₅₀ (по активной субстанции) составили 2 614 и 2 573 мг/кг соответственно.

При субхроническом курсовом внутрижелудочном введении препарата в дозе 200 мг/кг (по активной субстанции) интегральные показатели состояния животных – масса тела, потребление воды и корма, показатели сердечно-сосудистой системы, частота дыхания, температура тела, поведенческие реакции не различались как между подопытными группами.

По результатам определения массы внутренних органов у подопытных животных не зарегистрировано достоверных изменений относительной массы внутренних органов как у животных после курсового введения препарата, так и в контрольной группе.

По показателям периферической крови животных после курсового внутрижелудочного введения препарата не отличались от крыс контрольной группы.

При биохимическом исследовании не обнаружено отрицательного влияния изучаемого препарата, на функцию печени.

Отмечено одинаковое по выраженности и направленности влияние курсового внутривнутрижелудочного введения препарата на функциональное состояние почек. У подопытных животных обеих групп наблюдалось незначительное статистически значимое снижение уровня мочевины в сыворотке крови. При этом значения величины диуреза, удельного веса и pH мочи, активности креатинина в сыворотке крови после приема изучаемого препарата не изменялись.

Зафиксированные изменения в биохимических показателях у подопытных крыс как после введения препарата, так и контрольной группе были равно выражены и находились в пределах физиологических колебаний.

Результаты патоморфологического исследования внутренних органов крыс, получавших внутривнутрижелудочно изучаемый препарат в дозе 200 мг/кг, свидетельствуют об отсутствии патологических изменений макро- и микроструктуры изученных органов подопытных животных при сопоставлении с животными контрольной группы.

После курсового внутривнутрижелудочного введения крысам изучаемого препарата и препарата сравнения не обнаружено существенных макро- и микроскопических признаков местного раздражающего действия в отделах желудочно-кишечного тракта, а также значимых особенностей и отличий картины вскрытия от контроля.

Выводы

1. Установлено, что коллоидный субцитрат висмута, используемый в качестве лекарственной субстанции в противоязвенных препаратах, представляет собой висмут-калий-аммоний цитрат состава $\text{Bi}_6(\text{OH})_6(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_4][\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_x[(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_y$, где $x = 3.2-4.2$; $a = 0.8-1.8$ с содержанием активного компонента в пересчете на оксид висмута 38.5-42.0 %.
2. Показано, что висмут-калий-аммоний цитрат высокой чистоты может быть получен из металлического висмута, обычно используемого в синтезе его соединений. Способ включает очистку висмута от сопутствующих металлов в результате его осаждения в виде оксогидроксонитрата состава $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{OH})_4](\text{NO}_3)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ с последующим переводом его в цитрат состава $\text{BiC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ по реакции взаимодействия с растворами лимонной кислоты, растворением полученного цитрата в водном растворе гидроксида калия в присутствии гидроксида аммония с последующей кристаллизацией продукта упариванием при $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$ или распылительной сушкой при 230°C . По результатам выполненных доклинических сравнительных исследований сделан вывод о безопасности изученного препарата.

Литература

- [1] R. Thesen, H. Liekfeld, H. Morck. Коллоидный субцитрат висмута для терапии язвы. *Pharm. Ztg.* **1988**. Bd.133. No.51/52. P.34-37.
- [2] R.J.L.F. Loffeld. *Helicobacter pylori* – основной фактор развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. *Русский медицин. журн.* **1995**. Vol.1. No.4. P.22-24.
- [3] Лапина Т.Л. Российские рекомендации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori*. В кн.: Ивашкин В.Т. и соавт. *Helicobacter pylori: революция в гастроэнтерологии. М.: «Триада-Х».* **1999**. С.161-174.
- [4] Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. М.: ИД. *Медпрактика.* **2003**. 412с.
- [5] European *Helicobacter pylori* Study Group. Current European concept on the management of *Helicobacter pylori* infection. *The Maastricht consensus report (12–13 September 1996). EHPSG Secretariat colition.* **1996**. P.2.
- [6] Регистр лекарственных средств России. Москва: РЛС. **2009. 2008**. 1440с.
- [7] Пат. № 83-01001W0, МКИ А61 К9/14, 31/29. Bismuth containing composition for treating peptic ulcers. P.J.H. Bos, D.J.C. Endel, J.H. De №304372; Заявл. 22.09.81. Оpubл. 31.03.83; *Изобрет. в СССР и за рубежом.* **1983**. Вып.3. №20.
- [8] Пат. 148307. Польша МКИ А61 К 31/29. Sposob otrzymywania cytrynianu Bizmutano-amonowo-potasowego. L. Lemiesz, K. Marszal, L. Plaszynski №261044. Заявл. 13.08.86. Оpubл. 31.03.90. *РЖХ.* **1991**. 10090П.
- [9] Пат. 155743 Польша, МКИ С07С 59/265, А61К 31/29. Способ получения основного трикалий-висмут-цитрата. S. Zielinsky, B. Pfeiffer, D. Domanska. Заявл. 26.12.88; Оpubл. 30.09.92. *РЖХ.* **1994**. 60202.

- [10] Пат. 547096 Испания, МКИ С07С 59/265. Salvador D.D. Заявл. 19.09.85; Оpubл. 16.03.86. *СА*. **1987**. Vol.106. 55983.
- [11] Пат. 280575 Чехия, МКИ С07С 59/265, 51/41. Способ получения основного цитрата висмута. А. Nováček, J. Voves, V. Holà, A. Dlabač, O. Gattnar. № 3110-91; Заявл. 14.10.91; Оpubл. 14.02.96. *РЖХ*. **98**. 10023П.
- [12] Пат. 2189942. МПК С01D13/00, С01G29/00, С07С59/265. Способ получения висмут-калий-аммоний цитрата. Юхин Ю.М., Афонина Л.И., Апарнев А.И., Данилова Л.Е. Заявка № 2001119149/12. Заявлено 26.06.2001. Оpubл.: 27.09.2002, БИ №27.
- [13] Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*. **2012**. С.13-39.
- [14] Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: *МЕДпресс-информ*. **2004**. 920 с.
- [15] Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*. **2012**. С.13-39.
- [16] Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях (МР №2166-80). Киев. **1980**. 47с.
- [17] Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие. – 3-е изд., доп. и перераб. Омск-Орел: *Омская областная типография*. **2006**. 290с.
- [18] D.J. Finney. Probit Analysis (3rd edition). *Cambridge University Press, Cambridge, UK*. **1971**. 318 p.
- [19] E.J. Freireich, E. Gehan, D. Rall at al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, rabbit, cat, dog, monkey and man. *Cancer Chemother. Rep*. **1966**. Vol.50. No.4. P.219-244.
- [20] W.A. Herrmann, E. Herdweck, L. Pajdla. The crystal and molecular structure of the ammonium bismuth citrate dihydrate $[(\text{NH}_4)^+\text{Bi}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)^-] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Z. Kristallogr*. **1992**. Vol.198. P.257-264.