

На правах рукописи



Бобок Максим Николаевич

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДЕСИНХРОНОЗА**

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Кандидат фармацевтических наук, доцент

Козлова Жанна Михайловна

Официальные оппоненты:

Мустафин Руслан Ибрагимович, кандидат фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедрой фармацевтической химии с курсом аналитической и токсикологической химии, заведующий кафедрой

Бубенчикова Валентина Николаевна, доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» апреля 2022 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар., д. 37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета ДСУ 208.002.01
доктор фармацевтических наук,
профессор

Селиванова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нарушения биологических ритмов организма (десинхроноз) возникают при рассогласовании его внешних и внутренних ритмов и условий внешней среды. Причиной этого рассогласования могут быть как патология систем или органов, так и трансмеридианные перелеты, работа в ночное время, стресс и пр. В свою очередь, нарушение естественной структуры биоритмов приводит к дальнейшему нарушению процесса адаптации организма. Десинхроноз проявляется нарушением сна, головной болью, дневной сонливостью, снижением работоспособности, снижением резистентности организма и др.

Исследователи этой патологии отмечают, что среди лекарственных препаратов, применяемых в медицинской практике для ее коррекции, практически отсутствуют лекарственные средства специфического действия, способные нормализовать состояние организма человека.

В решении этой проблемы особое место занимают препараты, обладающие адаптогенной активностью. Благодаря широкому системному спектру действия адаптогены способны в достаточно короткие сроки оптимизировать функциональное состояние организма, нарушенное в результате изменения биологических ритмов.

Важными соединениями, играющими роль в коррекции нарушений, связанных с десинхронозом, являются антиоксиданты. В процессе адаптации они играют одну из ключевых ролей, поскольку процесс интенсивного перекисного окисления липидов характерен для стресса.

В результате анализа патентной и другой литературы не обнаружено эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС) способных нивелировать последствия воздействия десинхроноза.

Исходя из вышеизложенного, разработка и оценка качества отечественных оригинальных готовых лекарственных форм для коррекции десинхроноз-индуцированных нарушений, удобных в применении и стабильных при хранении,

и содержащих адаптогены растительного происхождения и синтетических ЛС является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Создание безопасных и эффективных средств для профилактики нарушений процессов адаптации организма к быстро меняющимся условиям внешней среды и стрессу - одна из задач современной медицины. До настоящего времени не проводилась разработка состава и технологии получения комплексного лекарственного средства на основе падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислоты в форме твердых желатиновых капсул с гранулированными сухими экстрактами.

Цель и задачи исследования

Цель исследования - разработка и исследование лекарственной формы (ЛФ) для перорального применения, предназначенной для лечения десинхроноза.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ научных публикаций, с целью обоснования выбора:
 - адаптогенов растительного происхождения и синтетических, перспективных для использования в качестве действующих веществ ЛС для лечения десинхроноза, методов их идентификации и количественного определения биологически активных веществ (БАВ);
 - вида лекарственной формы и изучения современных подходов к технологии ее получения.
2. Изучить характеристики подлинности и показатели качества растительного сырья природного происхождения, необходимые для разработки стандартной технологии его дальнейшей переработки в ЛФ.
3. Разработать технологию получения сухого экстракта листьев падуба парагвайского, содержащего комплекс БАВ.
4. Изучить состав сухого экстракта листьев падуба парагвайского сухого, определить его физико-химические и технологические характеристики.

5. Разработать оптимальный состав и технологию получения твердых желатиновых капсул с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой.

6. Определить показатели качества и их нормативы, условия хранения и сроки годности твердых капсул с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой.

7. Оценить эффективность хронокорректирующего действия и адаптогенной активности полученной ЛФ в эксперименте *in vivo*.

8. На основании проведенных исследований и полученных результатов разработать проекты нормативной документации на твердые желатиновые капсулы с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой.

Научная новизна исследования

Научно обоснован состав БАВ лекарственного средства для коррекции десинхроноза, включающий экстракты падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарную кислоту. Научная новизна подтверждена патентом РФ № 2577701 от 20.03.2016 «Средство, обладающее хронокорректирующей и адаптогенной активностью».

Впервые охарактеризовано растительное сырье листья падуба парагвайского по показателям: экстрактивные вещества, дубильные вещества, сумма флавоноидов, зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, частицы сырья, утратившие окраску, органическая и минеральная примесь.

Разработан способ получения экстракта падуба парагвайского сухого методом противоточной экстракции с последующим упариванием извлечения и сублимационной сушкой. Определено количественное содержание экстрактивных веществ и кофеина на каждой стадии технологического процесса.

Разработана технология получения твердых желатиновых капсул с гранулятом смеси сухих экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего и кислотой янтарной (далее — СКЭП), полученным методом влажной

грануляции. Оценено качество полученной лекарственной формы, определен срок годности.

Разработана и валидирована методика количественного определения элеутерозидов В и Е методом ВЭЖХ в сухом экстракте элеутерококка колючего.

Разработана и апробирована методика моделирования десинхроноза с оценкой её влияния на лабораторных животных. Показана эффективность разработанной лекарственной формы при смоделированном десинхронозе в тестах: «вынужденное плавание» и «открытое поле», а также изучена её антиоксидантная активность.

Теоретическая и практическая значимость исследований

На основании полученных сведений о фармацевтико-технологических характеристиках и экстрагировании листьев падуба парагвайского, и изучении характеристик его сухого экстракта показана перспективность предложенной технологической схемы с целью получения средства для коррекции десинхронозов. Полученные данные дополняют литературные сведения, могут использоваться в дальнейших исследованиях и легли в основу нормативной документации на сырье листья падуба парагвайского, экстракт падуба парагвайского сухого и лекарственной формы СКЭП.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования послужили работы российских (И.А. Самылиной, Р.Н. Аляутдина, В.А. Куркина, Д.А. Муравьевой, С.И. Рапопорта, П.Ф. Кику, Ф.П. Крендаля и др.) и зарубежных (Т. Roenneberg, A.G. Panossian, G. Wikman, H. Wagner, G.P. Krueger и др.) ученых в области исследований биологических ритмов человека и разработки научных основ получения лекарственных средств на основе ЛРС.

Методология настоящей работы основана на всесторонней оценке объектов исследования, обосновании методов и условий их технологической переработки при создании ЛФ.

В ходе проведения экспериментальных исследований были использованы физико-химические и технологические методы, в том числе: противоточная

экстракция растительного сырья с использованием теоретических расчетов эффективности, сублимационная сушка, гранулирование и др. Также в работе использовали фармакопейные физико-химические, технологические и инструментальные методы анализа - ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС и другие аналитические методики с включением соответствующих методов статистической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

- Результаты разработки технологии получения сухого экстракта из растительного сырья листьев падуба парагвайского с учетом его фармацевтико-технологических характеристик,
- Результаты разработки состава и технологии получения твердых желатиновых капсул с экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой,
- Показатели качества, методики их определения и нормирование твердых желатиновых капсул с экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой,
- Результаты изучения стабильности полученной ЛФ с целью определения сроков годности,
- Результаты изучения хронокорректирующего действия и адаптогенной активности полученного комплексного лекарственного средства *in vivo*.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы научных исследований по теме диссертации были представлены на: Научно-практической конференции «Достижения и перспективы молодых ученых НИИФ», 04 ноябрь 2013 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия; Научно-практической конференции с международным участием «Разработка и регистрация лекарственных средств: технологические аспекты», 28 ноября 2013 г, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, Россия; V Научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств», 20 марта 2014 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия;

Научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии», 28 мая 2014 г, ГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия; Конференции «Актуальные аспекты разработки современных инновационных лекарственных средств и их потенциальная научно и социально-экономическая значимость», 10 декабря 2014 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия; Научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической технологии и биофармации» им. А.И. Тенцовой, 20 октября 2015 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия; VI Научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств», 19 марта 2015 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия; VII Научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств», 24 марта 2016 г, НИИ Фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия.

Апробация диссертационной работы состоялась 27 октября 2021 года на заседании кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Внедрение результатов

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр фармацевтической технологии, фармацевтического естествознания, фармакологии, аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в учебный процесс кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором лично был произведен обзор литературы по теме диссертационной работы. Автором самостоятельно выполнена экспериментальная часть

исследования, проведен анализ полученных результатов и их статистическая обработка. Автором написаны публикации и проекты лабораторных регламентов. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3, 4 и 6 паспорта специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Выполнение работы осуществлено по теме и плану научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств», номер государственной регистрации 01201261653.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, отражающих основные результаты диссертации, в том числе 3 научные статьи – в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России (из них - 2 научных статьи в журналах, входящих в международные базы данных (Web of Science, Scopus).

Структура и объем диссертации

В составе работы представлены введение, обзор литературных источников, приведенный в первой главе, описание материалов и исследовательских методик, которые приведены во второй главе, результаты исследований, проведенных самостоятельно, которые можно увидеть в третьей и четвертой главах, общие выводы, список сокращений, перечень применяемых литературных источников, девять приложений. В работе 174 страницы печатного текста, 33 таблицы, 33 рисунка. В перечне применяемых литературных источников представлены 249 источников, 105 из них написаны на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись сырье листьев падуба парагвайского (образец сырья промышленного производства «Martin&Cia LTDA.S.A», торговой марки «DON LUCAS», серия AC14097, годен до 10.2018, сертифицированного INAL – Instituto Nacional De Alimentos (Национальный Институт Питания), масса сырья в 1 пачке - 500 г), элеутерококка субстанция-экстракт сухой (ООО «Хармс», Россия, в соответствии с ГФ XI и СанПин 2.3.2.10-78-01) и янтарная кислота, субстанция-порошок (ОАО «Марбиофарм», Россия, масса сырья в пачке - 3,0 кг), а также лекарственный препарат мелаксен[®], таблетки покрытые оболочкой (Юнифарм Инк, США).

В работе использовали современные вспомогательные вещества, удовлетворяющие требованиям современной нормативной документации. В качестве стандартных образцов (СО) использованы: элеутерозиды В и Е (ChromoDex, США), кофеин, теобромин, теофиллин и янтарной кислоты (Sigma-Aldrich, Германия).

Получение извлечений из растительного сырья (РС) осуществляли по разработанным методикам. Изучение химического состава РС, извлечений из него и лекарственной формы (ЛФ) СКЭП проводили методом ВЭЖХ на жидкостных хроматографах Waters Breeze (Waters, США) с УФ-детектором 2487 и Agilent 1200 оснащенным фотодиодноматричным детектором с длиной волны 210 нм (Agilent Technologies, США). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Chem Station (ver. B.03.01-SR1).

Подлинность элеутерозидов В и Е в экстракте элеутерококка сухом и ЛФ проводили методом УФ-спектрофотометрии на УФ-спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США) при длине волны 220 нм. Подлинность кофеина, теобромина, теофиллина устанавливали методом ТСХ.

Количественное содержание элеутерозидов В и Е устанавливали методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором MS 6120 (Agilent Technologies, США). Количественное содержание кофеина,

теобромина и теофиллина из сырья устанавливали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Breeze с УФ-детектором 2487 (Waters, США) при длине волны 275 нм.

Микроскопический анализ растительного сырья проводили на микроскопе Celestron Deluxe с LCD экраном (Celestron, США) в проходящем свете в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Для нахождения параметров экстрагирования сырья, были установлены: коэффициент поглощения сырья, коэффициент образования внутреннего сока и коэффициент увеличения объема при растворении экстрактивных веществ.

Для получения экстракта сухого применяли метод сублимационной сушки. Извлечение падуба парагвайского упаривали на вакуумно-выпарном аппарате (Heidolph Laborota 4010 digital, Германия) по общей схеме – давление 72 мБар, температура бани 60°C в течении 8 часов до уменьшения объема в 2 раза. Затем сгущённое извлечение замораживали в морозильной камере при -24°C в течение 8 часов. Кюветы с замороженным извлечением вынимали и помещали в камеру сублимационной сушилки Heto Drywinner ST/DW 60E (США) с вакуумно-роторным насосом RZ 2 (Vacuumbrand, Германия) на 24 часа при температуре 21°C, где создавали глубокий вакуум при давлении 0,01 мБар.

Для полученного экстракта падуба парагвайского сухого определяли следующие показатели: описание, микроскопическое исследование, количественное содержание, потеря в массе при высушивании, сыпучесть, угол естественного откоса, насыпной объем, тяжелые металлы, масса содержимого упаковки.

Исследование процесса гранулирования сухих растительных экстрактов проводили с использованием универсального лабораторного миксера гранулятора модели GLATT TDG (Glatt, Германия). Наполнение твердых желатиновых капсул проводили на настольной капсульной машине MF - 30 (ACG Pam Pharma Technologies Pvt. Ltd., Индия).

Полученную ЛФ СКЭП, согласно требованиям ОФС. 1.4.1.0005.18 «Капсуль», оценивали по показателям качества: описание, подлинность, однородность массы, количественное определение, распадаемость, растворение, микробиологическая чистота.

Оценку эффективности разработанного препарата проводили на модели *in vivo* в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармацевтических веществ» (Миронов А.Н., 2012). Моделирование светового десинхроноза осуществляли в 2 этапа. На первом этапе проводили установление экспериментального светового ритма у лабораторных животных в режиме 12 часов день: 12 часов ночь в течение 7 дней. На втором этапе проводили моделирование нарушения светового ритма путем сокращения темновой фазы светового цикла лампами дневного света (Beurer TL40, Германия) до 0 ч в течение 14 дней с продолжением введения исследуемых растворов. На 21-ый день эксперимента осуществляли оценку стресс-компетентных органов (печень, селезенка, тимус, надпочечники). Оценку адаптогенных эффектов проводили по классической методике теста Порсолта (вынужденного плавания) на 1-ый, 7-ой и 21-ый дни эксперимента.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США). В каждой группе рассчитывали средние арифметические значения показателя и стандартную ошибку среднего. Достоверность различий с соответствующими контрольными группами оценивали по t-критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результаты исследований

С целью стандартизации растительного сырья проведен фармакогностический и фитохимический анализ листьев падуба парагвайского в соответствии с требованиями фармакопейной статьи VII Фармакопеи Аргентины, Фармацевтического кодекса Германии, Французской фармакопеи и Государственной фармакопеи XIV издания (Таблица 1).

Таблица 1 - Числовые показатели сырья листьев падуба парагвайского

Показатель	Сырье листьев падуба парагвайского
Внешние признаки	Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы, а также фрагменты стеблей, проходящих сквозь сито с отверстиями 5 мм желтовато-зеленого, бурого и буровато-зеленого цвета с терпким запахом и своеобразным вкусом
Микроскопия	Верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток с прямыми равномерно утолщенными клеточными стенками. Для эпидермиса верхней стороны листа характерна лучистая морщинистость кутикулы (устыща отсутствуют), друзы оксалата кальция, воздухоносные полости и кольчатые сосуды по жилке. Для эпидермиса нижней стороны листа характерна продольная морщинистость кутикулы, вместилища с бурым содержимым. Многочисленные устьица крупные, овальные, окружены чечевицевидными устьичными клетками, находятся только на нижнем эпидермисе. Устьичный комплекс парацитного типа. Устьичный индекс: 7,13%
Экстрактивные вещества	38,63±0,16
Дубильные вещества	6,46±0,29
Сумма флавоноидов	1,89±0,05
Содержание кофеина	1,868±0,012
Влажность	4,25±0,13
Зола общая	5,36±0,06
Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты	0,39±0,08
Частицы сырья, утратившие окраску (побуревшие, потемневшие, выцветшие)	0,5±0,03
Другие частицы сырья, не соответствующие установленному описанию	0,7±0,03
Органическая примесь	0,02±0,001
Минеральная примесь	0,01±0,001

На основании проведенных исследований были предложены нормы качества листьев падуба парагвайского, которые могут дополнить существующую НД. Было установлено, что данные характеристики соответствуют требованиям Фармацевтического кодекса Германии, XI Французской фармакопее и VII Фармакопее Аргентины.

Для разработки ресурсосберегающей технологии экстракта листьев падуба парагвайского сухого необходимо было произвести теоретические расчеты эффективности экстрагирования, т.к. метод расчета противоточного

экстрагирования связывает математической зависимостью величину эффективности процесса экстрагирования с величиной соотношения внешней, внутренней концентрации экстрагируемых веществ и числом ступеней экстракции. Необходимо было определить величину соотношения фаз и число диффузоров (степеней экстракции) в батарее при экстрагировании сырья.

В таблице 2 приведены обобщенные результаты определения коэффициентов поглощения, образования внутреннего/внешнего сока и увеличения объема при растворении экстрактивных веществ листьев падуба парагвайского.

Таблица 2 - Технологические характеристики листьев падуба парагвайского

Технологические показатели	Численные значения
Коэффициент поглощения, см ³ /г по 25% спирту	1,89
Коэффициент образования внутреннего сока (K)	1,96
Величина образования внешнего сока γ , см ³ /г (y)	1,4
Коэффициент увеличения объема при растворении экстрактивных веществ	0,33

Для поиска оптимального числа диффузоров, предварительно, необходимо было определить постоянное значение коэффициента распределения веществ (η) по формуле: $\eta = y/K = 1,4/1,96 = 0,71$. С учетом технологических показателей, полученных в ходе предыдущих исследований, рассчитывали теоретическую эффективность метода противоточной экстракции в 3-х диффузорах при соотношении 1:1,4 по формуле:

$$S = 54,43 - 2,496 * 0,71 + \frac{0,71 * \lg 3}{0,007 - 0,0014 * 0,71 + 0,017 * 0,71^2} = 75,9\%$$

Рассчитывали прогнозируемую концентрацию БАВ методом противоточной экстракции в 3-х диффузорах, с 25% спиртом этиловым в качестве экстрагента при соотношении 1:1,4 по формуле:

$$C = \frac{100 * 38,63 * 75,9}{75,9(38,63 + 4,25) + 0,9632[104 * 1,4 - 75,9(0,33_{38,63} + 4,25)]} = 95,8\%$$

Теоретический расчет поэтапным способом для батареи с числом диффузоров от 3-х до 6-ти и соотношением фаз от 1,0 до 2,0 позволил установить, что при $n=4$, $y=1,2$ из сырья с содержанием экстрактивных веществ $38,63 \pm 0,16\%$ можно получить экстракт ($S=82,3 \pm 0,001\%$) с концентрацией прогнозируемой

концентрацией БАВ - $96,2 \pm 0,003\%$. Увеличение соотношения фаз или числа диффузоров, не приводит к существенным увеличениям эффективности, но значительно усложняет процесс экстракции и делает его дорогим.

Экстрагирование сырья осуществляли методом противоточной экстракции при температуре 75°C . Установка представляла собой батарею из 4-х экстракторов, объемом 40 л каждый. Соотношение сырья в экстракторах – 4:3:2:1 (масс). Общее количество сырья на одну операцию - 10 кг. Извлечение из сырья получали в соотношении 1 (масс):1,2 (об.ч.). Сублимационная сушка осуществлялась по следующей схеме: сгущенное извлечение замораживали при -24°C в течении 8 часов, затем на 24 часа сырье помещалось в сушильное устройство с вакуумно-роторным насосом где создавался глубокий вакуум (0,01 мБар). Результаты исследования технологических параметров экстракта падуба парагвайского сухого, полученного методом противоточной экстракции представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Показатели и нормы качества экстракта падуба парагвайского сухого

Показатель	Результат определения
Внешний вид	Сухой мелкодисперсный порошок коричневатого-бежевого цвета, иногда с зеленым оттенком
Количественное содержание основных действующих веществ, %:	
Кофеин	$2,015 \pm 0,009$
Теобромин	$0,181 \pm 0,012$
Теофиллин	$0,017 \pm 0,002$
Влажность, %	$3,31 \pm 0,1$
Насыпной объем:	
насыпной объем до уплотнения (V_0), мл	$160 \pm 1,9$
насыпной объем после уплотнения (V_{2500}), мл	$96 \pm 1,7$
Способность порошка к уплотнению ($V_{10} - V_{500}$), мл:	$20 \pm 1,6$
Насыпная плотность:	
насыпная плотность до уплотнения (m/V_0), г/мл	$0,36 \pm 0,7$
насыпная плотность после уплотнения (m/V_{2500}), г/мл	$0,61 \pm 0,3$
Сыпучесть ($d=10, 15, 25$ мм), г/с	Отсутствует
Угол естественного откоса, °	$37,5 \pm 1,8$
Индекс Carr, %	41
Коэффициент Hausner	1,69
Тяжелые металлы	ОФС.1.2.2.2.0012.15
Остаточные органические растворители	ОФС.1.1.0008.15

Обобщив фармакологические особенности экстрактов падуба парагвайского, элеутерококка колючего и субстанции-порошка янтарной кислоты, для дальнейших исследований была выбрана смесь этих активных веществ в соотношении 5:2:1 (250:100:50 мг). Для подбора режима гранулирования были разработаны вариации смеси активных и вспомогательных веществ представленные в таблице 4. В виде увлажняющих растворов были подобраны растворы с разной концентрацией и растворимых веществ.

Таблица 4 - Исследуемые составы смесей для грануляции ЛФ СКЭП

№	Состав смеси активных и вспомогательных веществ для грануляции		
1	Сумма активных веществ – 68,9%; Лактоза – 10,1%; LYCATAB [®] C – 20%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.	5	Сумма активных веществ – 68,9%; VIVAPUR [®] 101 – 23%; Vivasol [®] GF – 4,1%; Vivastar [®] P – 3%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.
2	Сумма активных веществ – 68,9%; Лактоза – 10,1%; LYCATAB [®] C – 16%; PROSOLVSMCC [®] 90 LM – 4,5%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 0,5%.	6	Сумма активных веществ – 68,9%; VIVAPUR [®] 101 – 22%; Vivasol [®] GF – 4,1%; Vivastar [®] P – 4%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.
3	Сумма активных веществ – 68,9%; Лактоза – 8,1%; LYCATAB [®] PGS – 14%; VIVAPUR 101 – 4,5%; Vivasol [®] GF – 2%; Vivastar [®] P – 1,5%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.	7	Сумма активных веществ – 68,9%; VIVAPUR [®] 103 – 23%; Vivasol [®] GF – 4%; Vivastar [®] P – 3,1%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.
4	Сумма активных веществ – 68,9%; Лактоза – 6,1%; VIVAPUR 101 – 20,5%; Vivasol [®] GF – 2%; Vivastar [®] P – 1,5%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.	8	Сумма активных веществ – 68,9%; VIVAPUR [®] 103 – 18%; VivasolGF – 5,1%; Vivastar [®] P – 2%; KLEPTOSE [®] – 5%; AEROPERL [®] 300 Pharma – 1%.

Предварительный анализ полученных гранулятов по показателям: внешний вид, степень сыпучести, содержание целевой фракции показал, что удовлетворительным размером гранул и наилучшей сыпучестью обладал гранулят № 7. Технологический процесс гранулирования активных и вспомогательных веществ состоял из трех стадий. На стадии I проводили смешивание ингредиентов: в первую очередь загружали отвешенные навески ВВ, за исключением Aeroperl[®] 300 pharma и перемешивали в течение 10 минут, затем в гранулятор загружали отвешенные навески сухих экстрактов и субстанцию-порошок янтарной кислоты,

перемешивали до однородности в течение 5 минут. На стадии II смесь увлажняли смачивающим агентом, количество которого варьировалось в пределах 3-10% от массы гранулируемой смеси. На стадии III вводили влагораспределяющий агент (Aeroperl® 300 pharma) и перемешивали.

Для достижения результата был подобран режим работы чопера и мешалки, который состоял из:

№ Стадии \ Регулируемый Параметр	Работа лопастей мешалки, об/мин	Работа чопера, об/мин	Время, мин
I стадия	300	300	5
II стадия	1000	2500	8
III стадия	1000	2750	2

Гранулят, для изготовления которого применяется метод влажной грануляции оценивали на возможность дальнейшего капсулирования. Для получения ЛФ был выбран гранулят сухого спиртового экстракта №7, обладавшего лучшими технологическими характеристиками (табл. 5).

Таблица 5 - Технологические характеристики гранулята № 7

Показатель	Результат определения	
Внешний вид	Однородный гранулят от светло-желтого до темно-коричневого цвета	
Фракционный состав	мм	%
	3 \geq	1,06 \pm 0,02
	2-0,2	96,83 \pm 0,01
	0,2 \leq	2,11 \pm 0,03
Влажность, %	4,13 \pm 0,02	
Насыпной объем:		
насыпной объем до уплотнения (V_0), мл	160 \pm 1,7	
насыпной объем после уплотнения (V_{2500}), мл	71 \pm 1,6	
Способность порошка к уплотнению ($V_{10} - V_{500}$), мл:	26 \pm 1,2	
Насыпная плотность:		
насыпная плотность до уплотнения (m/V_0), г/мл	0,43 \pm 0,02	
насыпная плотность после уплотнения (m/V_{2500}), г/мл	0,64 \pm 0,02	
Carr Index, %	32,8	
Hausner Ratio	1,49	
Сыпучесть (d=10, 15, 25 мм), г/с	7,6 \pm 0,02	
Угол естественного откоса, °	32,6 \pm 0,03	

Как ЛФ выбраны твердые желатиновые капсулы № 00, в которых представлен состав гранулята (таблица 6).

Таблица 6 - Состав гранулята, содержание действующих и ВВ на одну капсулу

Активные вещества:	в %	в мг
Падуб парагвайский экстракт сухой	43,1	250,0
Элеутерококка колочего экстракт сухой	17,2	100,0
Янтарная кислота	8,6	50,0
Вспомогательные вещества:		
Целлюлоза микрокристаллическая	23,0	133,0
Натрия крахмал гликолят	4,0	23,0
Кроскармеллоза натрия	3,1	18,0
Гранулированный оксид кремния	1,0	6,0
2 % раствор ПВП в спирте этиловом 70 %*	до 3% от массы сухой порошковой смеси	0,0003
Масса содержимого капсулы	100	580

* - удаляется при высушивании.

Технологическая схема представлена на рисунке 1.

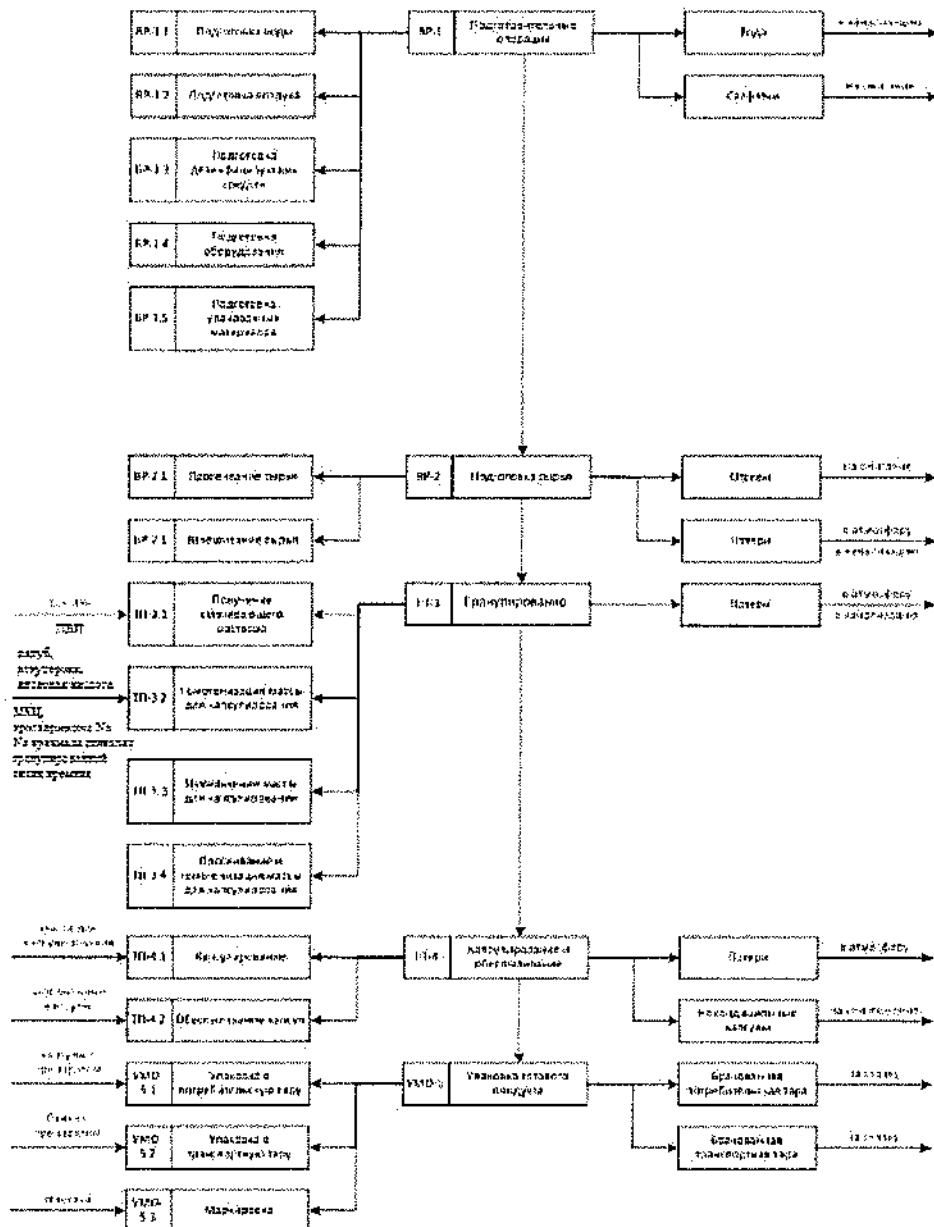


Рисунок 1 - Технологическая схема производства ЛФ СКЭП методом ВВ

Показатели и нормы качества для ЛФ СКЭП, представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Показатели и нормы качества для ЛФ СКЭП

Показатель качества	Методы испытания	Регламентируемый параметр
Описание	Органолептический	Капсулы твердые желатиновые: тело капсулы белое, крышечка капсулы красная. Содержимое капсулы: однородный гранулят от светло-желтого до темно-коричневого цвета.
Подлинность	1) Качественная реакция с резорцином 2) ТСХ	1) Красно-коричневое окрашивание раствора, которое переходит при подщелачивании в оранжево-желтый цвет с интенсивной желто-зеленой флуоресценцией. 2) Зона с фиолетовым окрашиванием для кофеина ($R_f=0,60$) и зона с бледно-голубым окрашиванием для элеутерозида В ($R_f=0,64$).
Средняя масса невскрытых капсул	ОФС.1.4.2.0009.15	$0,683 \pm 0,042$ г
Средняя масса содержимого капсулы	ОФС.1.4.2.0009.15	$0,576 \pm 0,039$ г
Количественное определение	ВЭЖХ ВЭЖХ ВЭЖХ	от 0,6 до 0,9% кофеина от 0,3 до 0,66% суммы элеутерозидов В и Е от 7 до 8,7% янтарной кислоты
Распадаемость	ОФС.1.4.2.0013.15	$10,9 \pm 0,2$ мин
Растворение	ОФС.1.4.2.0014.15	Элеутерозид В – $77,82 \pm 0,32\%$ Кофеин – $90,41 \pm 0,34\%$ Янтарная кислота – $96,33 \pm 0,26\%$
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 3А
Упаковка	В банки полимерные с гладкой горловиной	
Маркировка	Твердые желатиновые капсулы СКЭП	
Хранение	При температуре не выше 25°C .	
Срок годности	2 года.	

Исследование срока годности ЛФ СКЭП проводили путём хранения 8 серий капсул при температуре $18-22^{\circ}\text{C}$, а также влажности воздуха $65 \pm 1\%$ (ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»). Срок наблюдения составлял 24 месяца. Каждые 3 месяца исследовали внешний вид,

среднюю массу, подлинность, количественное содержание, распадаемость. Установлено, что при хранении в естественных условиях показатели качества твердых желатиновых капсул остаются неизменными в течение всего срока наблюдения. Исследование сроков годности позволяет утвердить рекомендуемый срок хранения: не более 2 лет при температуре не выше 25°C.

Следующим этапом исследования было изучение эффективности ЛФ СКЭП. Методика моделирования светового десинхроноза описана в разделе «Объекты и методы исследования».

По результатам исследований было установлено, что во всех контрольных группах животных наблюдалось мощное десинхронизирующее действие, которое выражалось в снижении исследовательской активности, времени плавания животных и негативном влиянии (истощении) стресс-компетентных органов (печень, селезенка, тимус и надпочечники) и снижении содержания антиоксидантов в сыворотке крови.

В отличие от контрольных групп, у животных, получавших ЛФ СКЭП увеличивалась исследовательская активность (снижался уровень тревожности по показателям вертикальной и двигательной активности), продолжительность плавания (увеличение на 110 и 68% у крыс и мышей, по сравнению с контрольной), оказывалось положительное воздействие на стресс-компетентные органы (уменьшение истощения селезенки, тимуса и надпочечников по сравнению с контрольной группой на 18, 27 и 20% у крыс и на 50, 48 и 45% у мышей соответственно), а также наблюдалась самая высокая АОА ($357,4 \pm 12,7$ мкмоль/л) в сыворотке крови животных при смоделированном двухнедельном десинхронозе.

Установленная суточная доза ЛФ СКЭП приводила к появлению хронокорректирующего эффекта и адаптогенной активности при наличии светового десинхроноза.

ВЫВОДЫ

1. На основании изучения научной литературы обоснована актуальность создания лекарственной формы для коррекции десинхроноза – капсул с сухими экстрактами листьев падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой.

2. Определены характеристики подлинности и показатели качества сырья измельченных листьев падуба парагвайского. С помощью качественных реакций и ТСХ подтверждено наличие в исходном сырье основных БАВ алкалоидной природы (кофеин, теобромин, теофиллин), а также с помощью методики ВЭЖХ установлено количественное содержание кофеина.

3. Разработан способ получения экстракта падуба парагвайского сухого методом противоточной экстракции с последующим упариванием извлечения и сублимационной сушкой. Определены условия проведения технологических этапов. Экстракция проводилась этиловым спиртом в концентрации 25% в батарее из 4-х диффузоров и соотношении фаз - 1,2 см³/г при температуре 75°C. Сушку экстракта проводили при глубоком вакууме (0,01 мБар) в течении 24 часов.

4. Определены показатели и нормы качества экстракта падуба парагвайского сухого. Определено количественное содержание пуриновых алкалоидов в полученном экстракте падуба парагвайского сухом: кофеина - 2,015±0,009%, теобромина - 0,181±0,012%, теофиллина - 0,017±0,002%. Низкие технологические характеристики экстракта – сыпучесть и угол естественного откоса обосновывают необходимость его гранулирования перед включением в ЛФ.

5. Научно обоснован и экспериментально подтвержден оптимальный состав ЛФ СКЭП: экстракт падуб парагвайский сухой 250,0 мг, экстракт элеутерококка колючего сухой 100,0 мг, янтарная кислота 50,0 мг, целлюлоза микрокристаллическая 133,0 мг, натрия крахмал гликолят 23,0 мг, гранулированный оксид кремния 6,0 мг, 2% раствор ПВП в спирте этиловом 70% 0,0003 мг (до 3% от массы сухой порошковой смеси). Теоретически и экспериментально обоснована технология изготовления твердых желатиновых капсул СКЭП.

6. В соответствии с современными требованиями установлены характеристики качества ЛФ и установлены их нормы: описание, средняя масса не вскрытых капсул ($0,683 \pm 0,042$ г), средняя масса содержимого капсул ($0,576 \pm 0,039$ г), подлинность, количественное содержание: кофеина ($0,86 \pm 0,01\%$), элеутерозидов В и Е ($0,62 \pm 0,04\%$), янтарной кислоты ($8,4 \pm 0,3\%$), распадаемость ($10,9 \pm 0,2$ мин), растворение ($96,33 \pm 0,26\%$), микробиологическая чистота (категория 3А). Изучена стабильность полученной ЛФ при хранении в естественных условиях. Срок годности составил 2 года.

7. Изучена эффективность комбинации исследуемой ЛФ СКЭП. Показано, что суточная доза активных веществ способна оказывать хронокорректирующее действие без нежелательных явлений для организма. Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют, что ЛФ СКЭП оказывает хронокорректирующее действие в условиях светового десинхроноза и обладает выраженной адаптогенной активностью.

8. На основании проведенных исследований и полученных результатов разработаны проекты НД: «Листья падуба парагвайского», «Экстракт падуба парагвайского сухой», «Твердые желатиновые капсулы с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой». Разработан лабораторный регламент на «Производство экстракта листьев падуба парагвайского (*Plex paraguariensis*) сухого».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная твердая лекарственная форма СКЭП на основе ЛРС может быть зарегистрирована как лекарственный препарат для коррекции десинхроноза, а разработанная технология получения твердых желатиновых капсул может быть масштабирована на производстве.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейшей разработки темы является наработка образцов ЛФ СКЭП для проведения полного объема доклинических исследований, а именно общей и специфической токсичности, фармакокинетических свойств, включая

биодоступность ЛП с целью расширения досье на лекарственный препарат и внедрения в медицинскую практику.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бобок М.Н.** Метод количественного определения фенольных гликозидов (элеутерозидов В и Е) в сухом экстракте элеутерококка / М.Н. Бобок, Л.А. Павлова, В.В. Смирнов // Бутлеровские сообщения. - 2014. - Т. 39 - № 8. - С.102-104.
2. **Бобок М.Н.** Разработка комбинированного лекарственного средства для коррекции десинхроноза / М.Н. Бобок, Л.А. Павлова // Евразийский Союз Ученых. 2014. - Т. 10. - С. 53-54.
3. **Бобок М.Н.** Разработка и исследование лекарственного средства для коррекции десинхроноза у лиц гериатрического возраста / М.Н. Бобок, Л.А. Павлова // Беликовские чтения: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. - 2015. – С. 52-53.
4. **Bobok M.N.** HPLC method for determination of eleutherosides E and B in dry extract of Siberian Ginseng / M.N. Bobok, L.A. Pavlova, V.V. Smirnov // European science review. – 2016. - № 3-4 - P. 315-317.
5. **Bobok M.N.** The effect of the light desynchronosis on the forced swimming duration of laboratory mice / M.N. Bobok, S.V. Kozin, L.A. Pavlova // American Scientific Journal. – 2016. - № 6. – P. 7-9.
6. **Бобок М.Н.** Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы для ускорения адаптационных механизмов при десинхронозе / М.Н. Бобок, Л.А. Павлова // **Биофармацевтический журнал.** - 2016. - Т. 8. - № 6. - С. 22-24. **[Перечень ВАК, Scopus].**
7. **Бобок М.Н.** Влияние светового десинхроноза на продолжительность вынужденного плавания мышей / М.Н. Бобок, Л.А. Павлова, С.В. Козин // **Биомедицина.** - 2017. - № 1. - С. 28-31. **[Перечень ВАК].**
8. **Бобок М.Н.** Разработка технологии получения и стандартизация сухих экстрактов *Plex paraguariensis* A. St. Hil. / О.Ю. Щепочкина, Е.А. Родионова, М.Н. Бобок, Л.А. Павлова // **Биофармацевтический журнал.** - 2019. - Т.11. - № 5. - С. 12-18. **[Перечень ВАК, Scopus].**

9. **Бобок М.Н.** Разработка технологии получения сухого экстракта падуба парагвайского (*ilex paraguariensis*) / М.Н. Бобок, И.И. Краснюк, И.И. Краснюк (мл.), В.В. Кугач, Ж.М. Козлова // Фармацевтический вестник. – 2020. - №2 (88). С. 70-75.
10. **Бобок М.Н.** Регуляция биологических ритмов. Современные способы коррекции десинхронозов / М.Н. Бобок, И.И. Краснюк, Ж.М. Козлова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2020. № 7 (97). С. 182-188.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВГ	- влажная грануляция	НД	- нормативная документация
ЛП	- лекарственный препарат	РС	- Растительное сырье
ЛФ	- лекарственная форма	СКЭП	- средство коррекции с экстрактом падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой