

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Бобок Максим Николаевич

**Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для
коррекции десинхроноза**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент
Козлова Жанна Михайловна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Биологические ритмы и их регуляция.....	12
1.1.1 Нарушение биологических ритмов (десинхроноз).....	14
1.1.2 Способы коррекции десинхронозов.....	17
1.1.3 Выбор действующих веществ для создания комплексного лекарственного средства для коррекции десинхроноза.....	27
1.2 Способы экстрагирования растительного сырья.....	32
1.3 Современные аспекты технологического процесса капсулирования лекарственных средств.....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1 Объекты исследования.....	39
2.2 Вспомогательные вещества.....	39
2.3 Стандартные вещества.....	41
2.4 Оборудование и посуда.....	41
2.5 Приготовление растворов.....	44
2.6 Методы исследования.....	47
2.6.1 Определение показателей качества сырья листьев падуба парагвайского.....	47
2.6.1.1 Методика количественного определения кофеина, теобромина и теофиллина из сырья листьев падуба парагвайского.....	54
2.6.2 Методы определения технологических параметров сухих экстрактов и гранулятов.....	56
2.6.2.1 Методика количественного определения янтарной кислоты.....	60
2.6.2.2 Методика количественного определения элеутерозидов В и Е.....	62
2.6.3 Определение эффективности ЛФ СКЭП.....	63
2.6.3.1 Определение антиоксидантной активности в плазме крови.....	65
2.6.4 Статистическая обработка результатов.....	66
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА ПАДУБА ПАРАГВАЙСКОГО СУХОГО.....	67
3.1 Определение подлинности и показателей качества сырья.....	67
3.1.1 Нормирование качества листьев падуба парагвайского.....	76
3.2 Выбор способа экстрагирования листьев падуба парагвайского.....	80
3.3 Технология получения экстракта листьев падуба парагвайского сухого.....	85
3.3.1 Показатели качества экстракта листьев падуба парагвайского сухого.....	91
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛФ СКЭП.....	97
4.1 Разработка состава и технологии получения ЛФ СКЭП.....	97
4.1.1 Изучение технологических характеристик действующих веществ.....	97
4.1.2 Определение смачиваемости сухих экстрактов.....	102
4.1.3 Выбор вспомогательных веществ.....	103
4.1.4 Подбор режима гранулирования и создание составов, предназначенных	

для грануляции	106
4.2 Технология получения ЛФ СКЭП.....	113
4.2.1 Оценка качества твердых желатиновых капсул СКЭП.....	117
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127
Приложение А. Патент РФ № 2577701 от 20.03.2016 «Средство, обладающее хронокорректирующей и адаптогенной активностью»	154
Приложение Б. Результаты доклинического изучения эффективности ЛФ СКЭП	155
Приложение В. Акт о внедрении	163
Приложение Г. Акт о внедрении	164
Приложение Д. Акт о внедрении	165
Приложение Е. Акт о внедрении	166
Приложение Ж. Акт о внедрении	167
Приложение И. Паспорт качества на лекарственное сырьё	168
Приложение К. Лабораторный регламент на производство экстракта листьев падубы парагвайского (<i>Plex Paraguariensis</i>) сухого	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нарушения биологических ритмов организма (десинхроноз) возникают при рассогласовании его внешних и внутренних ритмов и условий внешней среды. Причинами 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 полнотности 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» (Приложение А).

Впервые охарактеризовано растительное сырье листьев падуба парагвайского по показателям: экстрактивные вещества, дубильные вещества, сумма флаваноидов, 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 (Приложение Б).

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 падубы парагвайского с учетом его фармацевтико-технологических характеристик,
- Результаты разработки состава и технологии получения твердых желатиновых капсул с экстрактами падубы парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой,
- Показатели качества, методики их определения и нормирование твердых желатиновых капсул с экстрактами падубы 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 ноября 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 (Приложение В, Г, Д, Е, Ж).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические ритмы и их регуляция

Важный инструмент, который создала природа в живых организмах для того, чтобы они могли выжить и правильно функционировать, являются биоритмы. Это физиологические процессы, периодически повторяющиеся через равные промежутки времени, различающиеся по интенсивности и сложности задействованных структур [65, 109].

Среди основных характеристик, которыми обладают биоритмы (рисунок 1), можно выделить:

- период или временной отрезок между двумя пиками или впадинами, идущими друг за другом, волны, которая повторяется;
- акрофаза – время, когда наблюдается наивысший подъем ритма;
- батифаза – время, когда наблюдается самая глубокая впадина;
- мезор – среднее значение циркадного ритма, который подлежит изучению;
- амплитуда – разница, которая наблюдается между средним значением волны и пиком или впадиной [124, 152, 230].

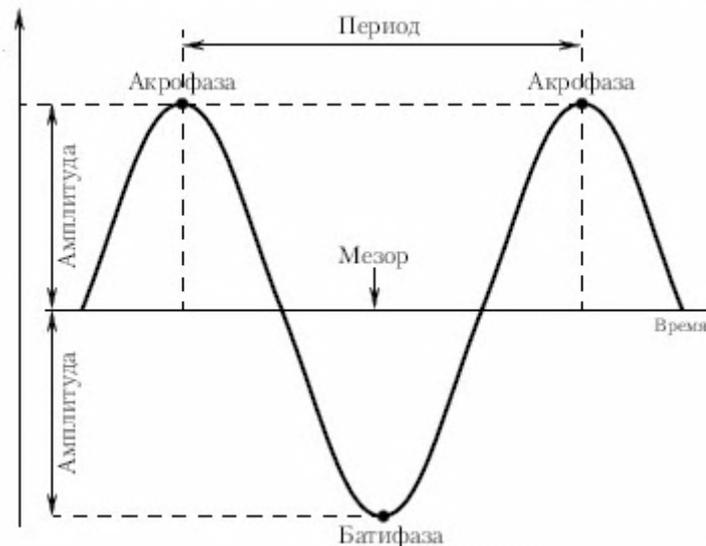


Рисунок 1 - Основные параметры биоритмов

Ритмичность изменений непосредственно связана с механизмами обратной связи, саморегуляцией (внутренней и внешней) и адаптацией [54, 70, 219, 225,

244].

Согласно современным представлениям, внутренняя регуляция биоритмов зависит от функционирования биологических часов. Биологические часы подразделяются на три уровня [153, 173, 236].

Первый уровень связан с деятельностью эпифиза (шишковидная железа). Эпифиз осуществляет функцию биологических часов, получая через зрительный анализатор информацию о времени суток. Физиологический контроль функции эпифиза осуществляется в значительной мере световым режимом: он активно воздействуя на органы внутренней секреции в световой период и значительно слабее – в ночной. Разрушение эпифиза или его связей со зрительным нервом приводит к нарушению функционирования многих биоритмов [62, 190].

Согласно современным представлениям, основным гормональным регулятором биоритмов является гормон мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), который синтезируется в секреторных клетках эпифиза и поступает оттуда в кровь [70]. Выработка мелатонина эпифизом зависит от времени суток и напрямую связана с освещенностью. Информация о дне или ночи (уровень освещенности), передается световым импульсом через сетчатку светочувствительных ганглиозных клеток глазного яблока. В ответ на эту информацию, мелатонин или вырабатывается в организме, или нет. Попадая в кровь, мелатонин действует, как эндокринный гормон и управляет биологическими функциями при регуляции циркадных ритмов, например, цикла сон-бодрствование. Мелатонин — редкий пример гормона, к которому имеются как мембранные (MTNR1A (MT1) и MTNR1B (MT2)), так и ядерные рецепторы [58, 160, 119].

Второй уровень биологических часов имеет отношение к супраоптическому элементу – супрахизматическому ядру гипоталамуса. Он посредством субкомиссурального тела имеет связи с эпифизом (рисунок 2). Через эту связь эпифиз получает сигналы от гипоталамуса и регулирует биоритмы далее. Разрушение супраоптической части гипоталамуса также ведет к нарушению биоритмов [162].

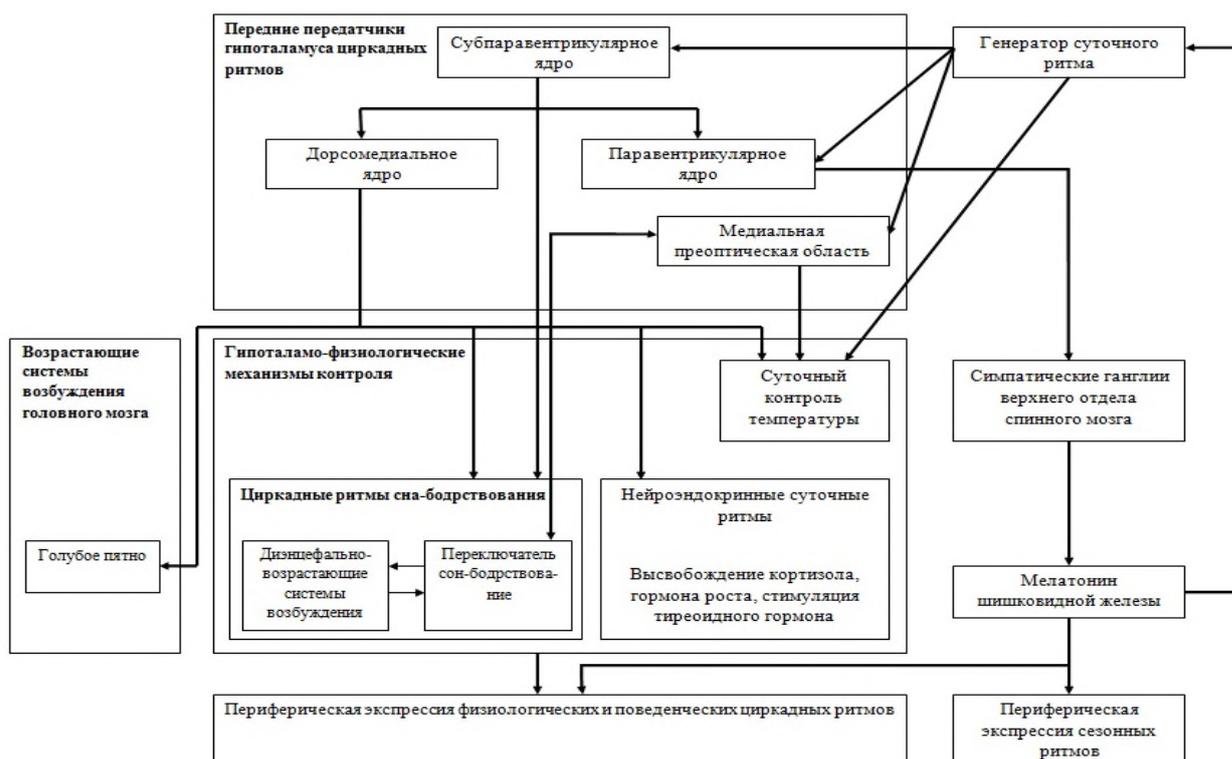


Рисунок 2 - Внутренняя регуляция циркадных ритмов

Третьей уровень биологических часов регулируется посредством состояния, в котором находятся липидно-белковые мембраны. Также важен уровень их проницаемости для ионов калия. У мембранных клеточных структур имеются рецепторные свойства, которые, при помощи потенциала покоя или действия, контролируют биоритмы [195].

В противоположность внутренней регуляции биоритмов, внешняя регуляция связана со сменой дня и ночи, вращением Земли вокруг своей оси и т.п. [56, 76]. Нарушение синхронизации внутренней регуляции биоритмов с внешней приводит к десинхронизации биологических ритмов (десинхроноз).

1.1.1 Нарушение биологических ритмов (десинхроноз)

Десинхронозом называют болезненное состояние, к которому приводит десинхронизация биоритмов. Среди проявлений такого состояния можно упомянуть проблемы с аппетитом и сном, уменьшение уровня работоспособности [67, 201, 200]. В качестве самого заметного проявления данного состояния можно упомянуть быстрое утомление, сопровождающееся уменьшением уровня

работоспособности. Также наблюдается недостаточно хорошая реакция на раздражители извне, нарушение психомоторной активности, которое можно увидеть через снижение внимательности, повышенную раздражительность, истощение нервной системы, депрессию. Это все приводит к нарушению физических нагрузок [67]. В процесс втягиваются вегетативная нервная, сердечно-сосудистая, иммунная, пищеварительная, эндокринная, антиоксидантная системы [24, 55, 59, 98].

В основе десинхроноза лежит 1) нарушение взаимоотношения фазовых ритмов организма (внутренний десинхроноз) и дискоординация существующих в норме периодов, и 2) фаз ритмов организма и внешней среды (внешний десинхроноз) [138].

Сущность внутреннего десинхроноза заключается в рассогласовании естественных циркадных ритмов разных органов и систем. Внешний же десинхроноз связан с раскоординацией внутренних ритмов организма со внешними раздражителями [116].

Кроме вышеперечисленного деления, десинхронозы, в зависимости от причины их вызывающей, могут быть также подразделены на острые и хронические, явные и скрытые, частичные и тотальные [66, 67].

В медицинской литературе синонимами десинхроноза являются: джетлаг, трансмеридианный дисхронизм (при авиапутешествиях), социальный десинхроноз и возрастной десинхроноз [29, 33, 41, 68, 145, 111, 218, 223]. На официальном сайте всемирной организации здравоохранения, десинхроноз описан термином «jetlag» [240]. Международная классификация болезней (МКБ – 10) включает десинхроноз в группу «Нарушения цикличности и бодрствования», которая имеет код G47.2. В данном документе к указанной проблеме относятся со значительным вниманием. Здесь десинхроноз является нозологической единицей (код 307.45-0) [145].

В группу риска входят люди, которые регулярно пересекают несколько часовых поясов (например, летный экипажи, дипломаты, политики, главы межнациональных корпораций, спортсмены и т.д.), а также работающие по

сменному графику, вахтовые рабочие, жители крупных городов, офисные работники. Они могут испытывать хронические симптомы нарушения сна, дневное недомогание, раздражительность снижение физической активности и производительности, что может приводить к развитию патогенных процессов [5, 26, 116, 127, 122].

Отсутствуют систематизированные сведения о том, каким образом на формирование десинхроноза воздействуют иные факторы. В соответствии с проведенными исследованиями, данное состояние чаще наблюдается у людей старше пятидесяти лет [41, 110, 182]. В процессе старения происходят комплексные изменения во временной организации биологических процессов, которые можно описать в качестве возрастного десинхроноза. В первую очередь, ухудшается внутренняя и внешняя регуляция функций организма и, как следствие, приспособительные возможности организма [27, 90]. Связано это с возрастными изменениями, которые наблюдаются в функции, которой обладает антиоксидантная, вегетативная нервная, пищеварительная системы. Также можно упомянуть гипofункцию эндокринных желез, чрезмерно высокий уровень чувствительности, ослабление функции, исполняемой сенсорными органами, иммунитетом, нарушения метаболизма т.д. [24, 41, 145].

На основании литературных данных можно предположить, что распад циркадианной системы протекает в обратной последовательности по сравнению с ее становлением. Когда имеет место старение, то в его рамках наблюдаются изменения в сфере временной организации биопроцессов. Данные изменения можно описать в качестве такого явления, как «возрастной десинхроноз». Так, в возрастной группе 60-75 года (пожилой возраст по классификации ВОЗ и МОТ) у большинства физиологических показателей наблюдается положительный фазовый сдвиг циркадианного ритма ($\approx 90-120$ мин.) с его последующей десинхронизацией [22, 41, 50, 135].

Диагностическими критериями десинхроноза являются [25, 89, 131, 148, 151, 163, 164, 172, 249, 227, 228]:

- A. Бессонница или гиперсонливость;
- B. Полисомнография и множественный тест латентности сна говорят о нарушении связи между сном и бодрствованием;
- C. Нет психических проблем, которые могли бы стать причиной симптомов;
- D. Симптомы не сочетаются с параметрами иных проблем со сном;
- E. Минимум два следующих явления:
 - дневная активность ↓ ;
 - нарушение аппетита или функции ЖКТ;
 - мочеиспускание ночью ↑ ;
 - слабость.

1.1.2 Способы коррекции десинхронозов

Среди подходов, улучшающих адаптацию человека к изменившимся условиям жизни, можно упомянуть нелекарственные и лекарственные методики лечения.

Среди способов устранения десинхроноза, для которых не применяются лекарственные препараты, можно упомянуть:

- Следование режиму, правильное сочетание сна-бодрствования, активности-отдыха и режим питания;
- Физическая активность, закаливание, пребывание на свежем воздухе;
- Светотерапия, электросон, синусоидальные модулированные токи, электростимуляция [41, 70, 85, 111].

Лекарственные способы коррекции десинхроноза

Учитывая роль эпифиза в центральной регуляции суточной ритмики организма, в качестве синхронизаторов биологических ритмов могут использоваться мелатонин, эпиталамин и другие препараты, содержащие мелатонин, его метаболиты, а также другие биологически активные вещества (БАВ), продуцируемые шишковидной железой, так или иначе участвующие в центральной регуляции суточных биоритмов организма [57, 98, 133, 142].

Мелатонин назначается как легкое снотворное средство, и рекомендуется, в том числе, перед длительными перелетами, ночными сменами, бессоннице и пр. Изучением эффективности мелатонина и его безопасности у тех людей, у которых наблюдались нарушения сна, занимались несколько ведущих медицинских учреждений России. Здесь следует упомянуть ПМГМУ им. И.М. Сеченова и РМАПО [44, 45, 77].

Однако, в экспериментальных исследованиях по изучению влияния действия мелатонина на организм было доказано, что препарат имел ряд противопоказаний: гиперчувствительность, выраженные нарушения функции почек, лейкемия, лимфома, лимфогранулематоз, миелома, сахарный диабет и хроническая почечная недостаточность [193].

В практике клинического применения лекарственного препарата, выявлены случаи развития нежелательных эффектов в период терапии мелатонином, в том числе: изменение формулы крови (тромбоцитопения, лейкопения), аллергические реакции, отеки (особенно, в первую неделю приема), повышенная раздражительность и возбудимость, чувство тревоги, бессонница, головная боль, необычные сновидения, раннее утреннее пробуждение, сухость слизистой оболочки рта, тошнота, рвота, диарея, утренняя сонливость [86].

В ряде работ описаны случаи использования препаратов, в основе которых используются янтарная кислота и витамины групп E, B, A, а также пиридоксин. Это приводило к тому, что влияние десинхронозов и отрицательных реакций адаптации сходило на нет. Достичь этого удалось посредством снижения силы перекисного окисления липидов [47, 48, 51, 74, 80, 92, 110, 118, 139].

Стоит обратить внимание, что для коррекции нарушений биологических ритмов в пожилом возрасте показаны витаминно-минеральные комплексы с растительными адаптогенами (которые обладают мягким психотонизирующим действием) [84, 102, 115].

Бузусловно, нормальный ритм сон-бодрствования можно также сохранить с помощью обычных снотворных средств. Наиболее широко применяемыми снотворными средствами для обеспечения сна в условиях смены часовых поясов

являются бензодиазепины и «небензодиазепиновые» препараты (например золпидем). В первую очередь механизм действия обусловлен усилением нейральной активности гамма-аминомасляной кислоты. Они эффективны в лечении десинхроноза, однако терапия часто сопровождается побочными эффектами (например, головная боль, тошнота, кратковременная потеря памяти, сухость и неприятный вкус во рту, галлюцинации, головокружение, сонливость, беспокойство, бессонница, спутанное сознание) и привыканием. Однако большинство снотворных не устраняют лежащий в основе десинхроноза срыв адаптационных механизмов и обычно, рекомендуются при коротком пересечении 4 и более часовых пояса. Когда необходима адаптация в месте прибытия, то рекомендуется комбинация снотворного короткого действия и хронобиотика вместе со стимулятором для поддержания дневной активности [193].

Психостимуляторы являются важными компонентами при лечении десинхронозов. Кофеин – метилксантиновое соединение, которое через накопление внутриклеточного, циклического аденозинмонофосфата (основной компонент внутренних часов) оказывает свое действие на процессы гликогенолиза, липолиза и стимуляцию метаболических процессов в органах и тканях, в том числе в мышечной ткани и ЦНС. Кофеин также связывается с рецепторами рианодина кальциевого канала, что приводит к высвобождению внутриклеточного Ca^{2+} .

В *in vivo* и *in vitro* исследованиях было показано, что кофеин удлиняет циркадный период ритмов конидиации у красной хлебной плесени (*Neurospora crassa*), фототаксический ритм у зеленой водоросли (*Chlamydomonas reinhardtii*) и ритм активности плодовой мухи (*Drosophila melanogaster*). Кофеин может резко снизить уровень мелатонина у людей в день введения и вызвать преждевременную экспрессию генов (c-Fos) в супрахиазматическом ядре грызунов. Кроме того, кофеин может продвигать и задерживать фазу ритма электрической активности в супрахиазматическом ядре изолированного мозга крысы и хомяка и удлинять период ритмов активности у мышей [149].

В клинических исследованиях у людей с нарушением биоритмов кофеин

улучшил формирование идей, мышление, память, ориентацию в пространстве, внимание и восприятие по сравнению с группой плацебо. Кофеин является распространенным средством лечения сонливости, вызванной сменой часовых поясов. Также, изучалось влияние кофеина после трансмеридионального путешествия на восток с использованием препаратов с медленным высвобождением в дозе 300 мг. Было продемонстрировано, что кофеин с медленным высвобождением обеспечивает более быструю ресинхронизацию гормональных ритмов. По оценке множественных тестов латентности сна было показано, что кофеин приводит к объективному снижению дневной сонливости по сравнению с мелатонином и плацебо [149].

Американская академия медицины сна разрешает использовать кофеин как один из вариантов лечения чрезмерной сонливости, связанной с быстрой сменой часовых поясов [145].

Из всех препаратов, которые могут применяться в случаях десинхронозов, с учетом выдвинутых требований, наиболее перспективными представляются средства, которые получены с применением компонентов растительного происхождения. Они должны демонстрировать адаптогенную активность [104, 110, 126]. Применение адаптогенов способно купировать симптомы десинхроноза, за счет увеличения адаптационных возможностей организма [10, 169, 170, 205, 216, 210, 222]. В настоящее время адаптогены растительного происхождения используются при различных патологиях, связанных с нарушениями ряда функций организма, что позволило за сравнительно короткий срок расширить набор лекарственных средств, получаемых из растений и обладающих адаптогенным действием. Также увеличилось количество растений, с доказанной адаптогенной активностью (таблица 1) [10, 184, 196, 206, 215].

Таблица 1 - Растения, обладающие адаптогенной активностью*

Растение	Семейство
Акантопанакс сидячецветковый – <i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Rupr. Et Maxim	Аралиевые
Альбиция ленкоранская – <i>Albizia julibrissin</i>	Бобовые
Аралия высокая, сердцевидная, маньчжурская – <i>Aralia elata</i> (Rupr. et Maxim); <i>A. cordata</i> , <i>A. Manshurica</i> (Rupr. Et Maxim)	Аралиевые

Продолжение Таблицы 1

Бадан толстолистный – <i>Bergenia crassifolia</i>	Камнеломковые
Бasilik священный – <i>Ocimum sanctum</i>	Яснотковые
Бакопа Моньери – <i>Bacopa monnieri</i>	Подорожниковые
Бриония белая – <i>Bryonia alba L.</i>	Тыквенные
Бутея односемянная – <i>Butea monosperma</i>	Бобовые
Витания снотворная – <i>Withania somnifera</i>	Пасленовые
Гарциния кола – <i>Garcinia kola</i>	Клузиевые
Гинкго двулопастный – <i>Ginkgo biloba</i>	Гинкговые
Евгения гвоздичная – <i>Eugenia caryophyllus</i>	Миртовые
Женьшень обыкновенный – <i>Panax ginseng**</i>	Аралиевые
Заманиха высокая – <i>Oplopanax elatus</i>	Аралиевые
Зверобой продырявленный – <i>Hypericum perforatum</i>	Зверобойные
Имбирь аптечный – <i>Zingiber officinale</i>	Имбирные
Калопанакс семилопастной – <i>Kalopanax septemlobus</i>	Аралиевые
Камелия китайская – <i>Camellia sinensis</i>	Чайные
Клитория тройчатая – <i>Clitoria ternatea</i>	Бобовые
Княжик сибирский – <i>Atragesisibirica</i>	Лютиковые
Кодонопсис мелковолоосистый – <i>Codonopsis pilosula</i>	Колокольчиковые
Кордицепс китайский – <i>Cordyceps sinensis</i>	Пиреномицеты
Кореньсумы – <i>Pfaffia paniculata</i>	Амарантовые
Куркулиго орхидеевидное – <i>Curculigo orchioides</i>	Лилейные
Левзея сафлоровидная – <i>Rhaponticum carthamooides</i>	Астровые
Лимонник китайский – <i>Schisandra chinensis**</i>	Магнолиевые
Мелия персидская – <i>Azadirachta indica</i>	Мелиевые
Момордика харанция – <i>Momordica charantia</i>	Тыквенные
Облепиха крушиновидная – <i>Hippophae rhamnoides</i>	Лоховые
Падуб парагвайский – <i>Ilex paraguariensis</i>	Падубовые
Полисиас папоротниколистный – <i>Poliscias filicifolia</i>	Аралиевые
Родиола розовая – <i>Rhodiola rosea L.**</i>	Толстянковые
Секуринега полукустарниковая – <i>Securinega suffruticosa</i>	Молочайные
Сидя сердцелистная – <i>Sida cordifolia</i>	Мальвовые
Стеркулия платанолистная – <i>Sterculia plantanifolia L.</i>	Стеркулиевые
Терминалия Чебула – <i>Terminalia chebula</i>	Комбретовые
Тиноспора сердцелистная – <i>Tinospora Cordifolia</i>	Луносемянниковые
Трихопус индийский – <i>Trichopus zeylanicus</i>	Трихоподовые
Филлантус эмблика – <i>Phyllanthus emblica</i>	Молочайные
Цезальпиния бондук – <i>Caesalpinia bonduc</i>	Бобовые
Центелла азиатская – <i>Centella asiatica</i>	Зонтичные
Шелковица белая – <i>Morus alba</i>	Тутовые
Шлемник байкальский – <i>Scutellaria baicalensis</i>	Яснотковые
Эвкомия вязолистная – <i>Eucommia ulmoides Oliv.</i>	Эвкоммиевые
Эвольвulus алзиновидный – <i>Evolvulus alsinoides L.</i>	Вьюнковые
Эклипта белая – <i>Eclipta alba</i>	Астровые
Элеутерококк колючий – <i>Eleutherococcus senticosus (Rupr. et Maxim)**</i>	Аралиевые
Эхинацея пурпурная – <i>Echinacea purpurea L.</i>	Астровые
Якорцы стелющиеся – <i>Tribulus terrestris</i>	Парнолистниковые

* по Panossian A. 1999; Mendes F.R. 2007; Rakocvic M. 2011; Белоусов Е.А. 2016

** - растение с хорошо зарекомендованными по литературным данным свойствами адаптогена растительного происхождения

Принцип снижения растительными адаптогенами стресс-реакции заключается в стабилизации всех систем организма, подвергающихся воздействию стресса (рисунок 3).



Рисунок 3 - Типичная схема реакции адаптации после приема адаптогенов [207, 208]

По данным доклинических и клинических исследований, широкий спектр биологического действия адаптогенов свидетельствует об их разнообразном и полностью не изученном до конца механизме действия [34, 61, 63, 207, 208].

Необходимо переводить биохимические реакции категории на пути экономии, что является важнейшим механизмом действия. Здесь подразумевается, что гликозиды приводят в активное состояние глюкозо-6-фосфотрансферазу, позволяющую тканям мышц, нервным клеткам и иммунитету продуцировать энергию в большем объеме. Это вызывает удлинение адаптации к стрессу [73].

На рисунке 4 рассмотрены направления действия адаптогенов на клеточный метаболизм, приводящие к адаптационному изменению функций, которые исполняют отдельные органы, системы, а также весь организм [63].

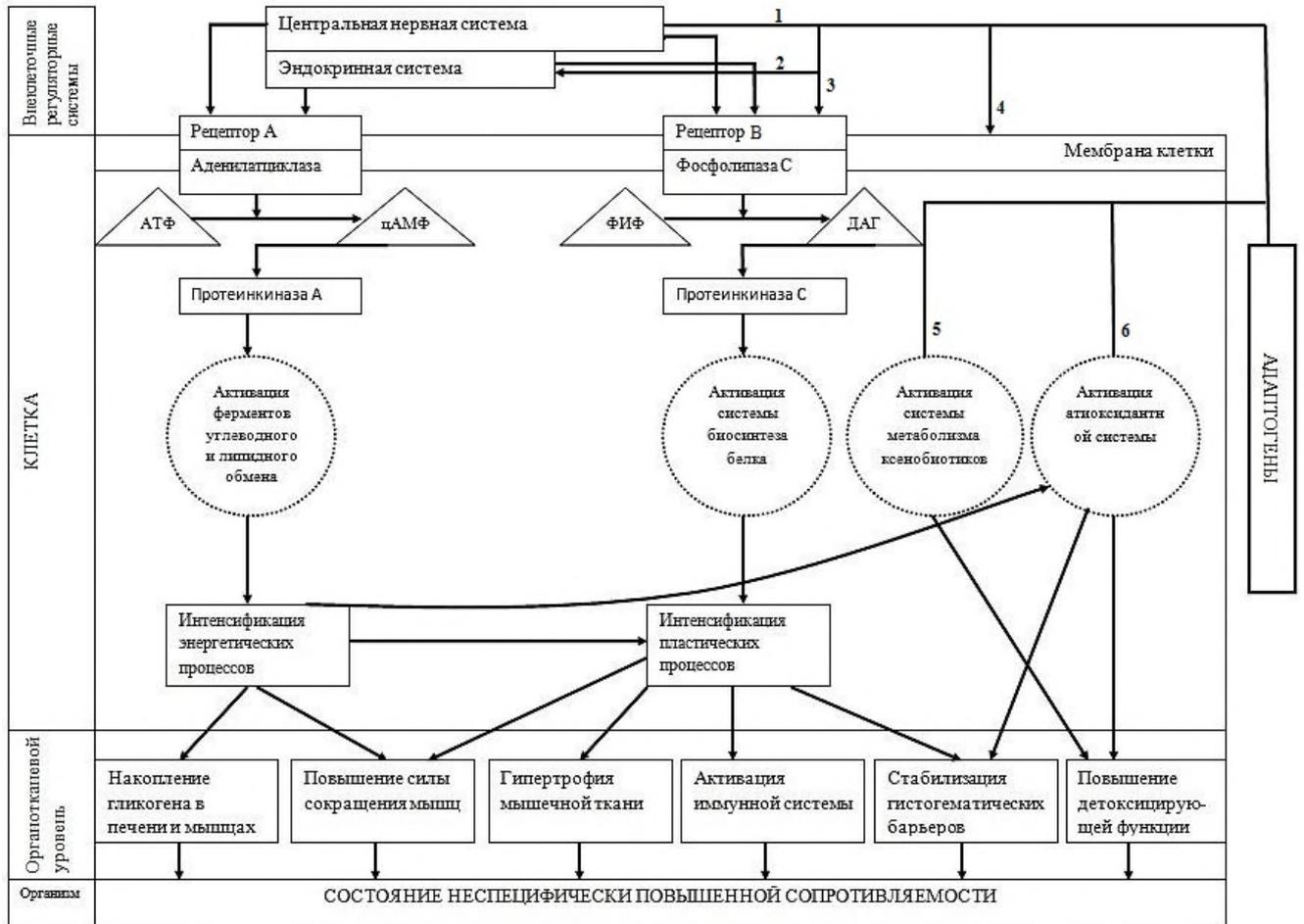


Рисунок 4 – Возможные особенности адаптационного изменения организма под воздействием адаптогенов

Адаптогены воздействуют на ЦНС (путь 1) и эндокринную систему (путь 2). Помимо этого, они могут изменять уровень их чувствительности к влиянию нейромедиаторов и гормонов (путь 3). В тканях адаптогены работают так, что гипофиз-адреналовая система подвергается меньшему напряжению, поэтому нет необходимости в выдаче стрессовой реакции или последняя становится менее интенсивной [7].

Адаптогены способны напрямую воздействовать на биомембраны (путь 4), повышая стабильность мембран, изменяя их селективную проницаемость и активность связанных с ними ферментов, активизировать различные внутриклеточные системы (путь 5 и 6), а также пополнять эндогенный фонд антиокислительной системы. Причиной является тот факт, что значительное количество адаптогенов – это соединения редокс-активной категории. У них наблюдаются способности препятствовать окислению [7].

Биологическое действие ряда широко известных адаптогенов (женьшень обыкновенный, элеутерококк колючий, родиола розовая и лимонник китайский) систематизировано и приведено в таблице 2 [69, 82, 96, 117, 125, 141].

Таблица 2 - Сравнение биологического действия типичных адаптогенов (женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, родиолы розовой и лимонника китайского) по данным экспериментальных и клинических исследований*

Эффект фитоадаптогена или аспект его применения	Женьшень обыкновенный (<i>Panax ginseng</i> C.A. May)	Элеутерококк колючий (<i>Eleuterococcus senticosus</i> Maxim)	Родиола розовая (<i>Rhodiolarosea</i> L.)	Лимонник китайский (<i>Schisandra chinensis</i>)	
Антигипоксическое действие	Высокое	Достоверное, выраженное	достаточно	Наиболее сильное из всех рассматриваемых адаптогенов	Присутствует
Актопротекторное действие	Высокое				Слабое
Антибактериальное действие	Отсутствует		Отсутствует		Присутствует
Влияние на систему иммунитета	Оказывают иммуномодулирующее действие, однако противопоказаны в острый период инфекционных заболеваний		Оказывает иммуномодулирующее действие		Укрепляет иммунную систему
Антиаритмическое	Имеется	Уступает родиоле розовой, но превосходит женьшень		Превосходит женьшень и элеутерококк	Отсутствует
Тонизирующее действие на ЦНС	Имеется, очень мягкое		Наиболее выраженное, но имеющее непродолжительное действие (в течение 1 суток после приема)		Усиливает процессы возбуждения в ЦНС
Ноотропное действие	Имеется	Имеется		Имеется, хорошо выражено	Имеется, достаточно высокое
Влияние на артериальное давление	Повышает				
Антиоксидантное действие	Имеется		Сильное		Во много раз превосходит действие витамина Е
Мембранотропное действие	Выраженное мембраностабилизирующее действие				Отсутствует
Антистрессорное действие	Сильное	Сильное		Сильное	Выраженное

Продолжение Таблицы 2

Влияние на систему желез внутренней секреции	Оказывают стимулирующее и нормализующее действие			
Гонадотропное действие	Оказывает специфическое гонадотропное действие	Действие женьшеню аналогично	Изучено недостаточно	Отсутствует

* - по: *Одинец А.Д., 2011; Корепанов С.В., 2012; Симонова Н.В., 2010; Шерманова К.А. 2014; Литвин Ф.Б., 2014; Убеева И.П., 2013.*

1.1.3 Выбор действующих веществ для создания комплексного лекарственного средства для коррекции десинхроноза

Создание лекарственного средства, корректирующего нарушения вызванные десинхронозом предполагает 1) длительное применение 2) повышение уровня ресурсных систем организма, и 3) безопасность применения.

Выдвинутым критериям соответствовали адаптогены растительного происхождения, антиоксиданты и метаболитические вещества.

Адаптогены растительного происхождения активно воздействуют на систему метаболизма клетки, антиоксидантную систему, интенсификацию энергетических и пластических процессов, что делает их незаменимыми при выборе объектов для разработки препаратов для устранения десинхроноза, а также его предупреждения.

Анализируя растительное сырье, приведенное в таблице 1 можно отметить, что наиболее широко изучены и используются на территории РФ женьшень обыкновенный, элеутерококк колючий, родиола розовая и лимонник китайский. Среди перечисленных растений особую роль играет элеутерококк колючий, препараты которого нашли применение в терапии патологий, связанных с переутомлением, астенических и депрессивных состояний различной этиологии, неврозах и других нарушениях нервной системы [2, 49, 93, 125].

Физиологически активными веществами элеутерококка колючего – *Eleutherococcus senticosus* Rupr. Et Maxim., семейство аралиевые – *Araliaceae*, являются гликозиды. Группа элеутерозидов состоит из элеутерозидов А (даукостерин), В (сирингин), В1 (изофраксидин-7-О-глюкозид), В2, В3, В4 (сезамин), С (метил- α -D-галактозид), D, E (сирингарезинол-ди-О- β -D-глюкозид), E1 (сирингарезинол-О- β -D-глюкозид), E2 (эписирингарезинол 4''-О- β -D-глюкозид), F, G, I, K, L и M (хедерасапонин В) Содержание элеутерозидов В (сирингин, представляет собой моноглюкозид 4- β -глюкозид синапового спирта) и E (диглюкозид сирингарезинола) превышает содержание остальных гликозидов [72, 91, 241].

Элеутерококк колючий описан в фармакопеях ряда стран: Государственная фармакопея XIV (ФС.2.5.0053.15); Британская фармакопея 2013; Европейская фармакопея 8.0; Американская фармакопея (USP 39-NF 34), а также в Американской травяной фармакопее 2011 [39, 146, 158, 175, 234].

Экстракт элеутерокока колючего возбуждает центральную нервную систему, повышает умственную и физическую работоспособность, функциональную подвижность мышц и нервно-мышечного аппарата, жизненную емкость легких, массу тела, содержание гемоглобина в крови, остроту зрения и слуха, адаптационные способности организма в экстремальных ситуациях, снижает уровень стрессовых реакций [198].

Отсутствие сезонности действия, характерной для элеутерококка, апробированность в клинической практике, делают это растение весьма привлекательным при разработке лекарственного средства для лечения десинхроноза.

Также, по данным таблицы 1, большой интерес представляет такое растение, как Падуб парагвайский – *Plex paraguariensis* A. St.-Hil, семейство падубовые – Aquifoliaceae, вечнозеленое дерево высотой до 13 м. Падуб парагвайский много лет привлекает внимание исследователей Европы, Латинской и Северной Америки, как широко используемое в быту, а также при экстремальных состояниях (гипоксия, термальные перегрузки, хронический стресс и т.д.) растение [179, 183, 192, 217, 247].

В РФ, исследования падуба парагвайского проходили на базе ПМГМУ им И.М. Сеченова [11, 12, 108].

Падуб парагвайский содержит такие алкалоиды, как: кофеин (0,5-2,5%), теобромин (0,01-0,8%) и теофиллин (0,1-0,4%) [178]. По литературным данным, в сырье присутствуют: галловая, кофейная, сиригловая, феруловая, п-кумаровая кислоты; флавоноиды: кверцетин (0,003%), рутин (0,06%) и кемпферол (0,0012%); содержание сапонинов (урсоловая кислота и карофиллин) изменяется от 5 до 10%; каротин (0,0004-0,0023%); аскорбиновая кислота (0,02-0,2%); микро- и макроэлементы: Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, и Rb [155, 178].

Падуб парагвайский описан в фармакопеях ряда стран: Фармакопея Аргентины VII изд (YERBA MATE, hoja y tallo), Фармакопея Франции XI изд. (MATÉ. *Ilici paraguariensis* folium), Фармацевтическом кодексе Германии (Geröstete mateblätter (M-065) и Grüne mateblätter (M-066)), а также в Британской травяной фармакопее 1996 [157, 167, 168, 177, 212].

Ряд исследователей показал целесообразность использования падуба парагвайского в разработке лекарственных средств с целью защиты биологических систем от оксидативного стресса [194, 204].

Наиболее заметными соединениями в сырье падуба парагвайского являются кофеин, теобромин и теофиллин, которые объясняются его тонизирующие свойства [181]. Водные извлечения падуба парагвайского обладают кардиопротективным, тонизирующим, иммуномодулирующим, антиоксидантным действием, и применяются для лечения хронических заболеваний, умственной и физической усталости, при сниженном иммунитете, а также при простуде, лихорадочных состояниях. Наиболее заметной из биологических активностей падуба парагвайского является его высокая антиоксидантная способность. Эта способность объясняется и прямо пропорциональна его высокой концентрации полифенолов. Благодаря широкому спектру биологической активности падуба парагвайского и высокой концентрации БАВ, он является идеальным материалом для экстракции этих соединений с целью использования в качестве лекарственного средства [188, 199]. На базе Медицинского Университета Рио-Гранде-ду-Сул, было установлено, что водные извлечения из падуба парагвайского не изменяет структуру сна [191].

При подборе состава комплексного средства для коррекции десинхроноза, целесообразно использовать соединения, обладающие антиоксидантными свойствами. Их способность снижать интенсивность протекания перекисного окисления липидов, повышать содержание восстановленного глутатиона, восстанавливать тиол-дисульфидный статус клетки и повышать активность антиоксидантных ферментов, является важным механизмом защиты при влиянии десинхроноза на организм на клеточном уровне. К такому соединению относится

кислота янтарная или соли на ее основе (сукцинаты K, Na, Ca, NH₄). Применение препаратов янтарной кислоты (бутан-1,2-дикарбоновая кислота), позволяет нивелировать негативное влияние, оказываемое десинхронозами, а также реакции, связанные с адаптацией и являющиеся нестандартными. Этого добиваются посредством снижения интенсивности перекисного окисления липидов [42, 48, 136]. Сукцинат-ион способствует усилению активности сукцинатдегидрогеназы - одного из основных компонентов внутриклеточной энергетике, что ведет к энергопродукции дыхательной цепи митохондрий, следовательно, и к значительному ускорению процесса АТФ и восстановительных эквивалентов. Важно отметить, что добавление янтарной кислоты к разным препаратам метаболического типа действия, как правило, усиливает их основные фармакологические эффекты, в частности антигипоксическое и/или антиоксидантное действие [28, 51, 81, 94, 101].

Кислота янтарная и ее соли способны оказывать антигипоксическое, гепато-, нефро-, кардиопротекторное энергезирующее, детоксицирующее и антиоксидантное действие. Они участвуют в активации симпато-адреналовой и ренин-ангиотензивной системы [8, 51, 95, 97].

Использование кислоты янтарной нормируется Американской фармакопеей (USP 39-NF 34) [234].

Обзор современного ассортимента адаптогенных препаратов зарегистрированных в РФ, указывает на значительное количество растительных, тонизирующих и адаптогенных средств (таблица 3). Однако, отсутствуют комбинации ЛС способные нивелировать последствия воздействия десинхроноза. Это обстоятельство диктует необходимость расширения ассортимента лекарственных средств, применяемых при десинхронозах.

Таблица 3 - Лекарственные препараты зарегистрированные на территории Российской Федерации (элеутерококк колючий, янтарная кислота)

Наименование	Производитель	Номер НД
Элеутерококк колючий		
«Элеутерококка жидкий» экстракт	ОАО «Пермфармация», Россия	ЛП 002555-310714
	ООО «БЭГРИФ», Россия	ЛП 002360-040214
	ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика», Россия	ЛП 001973-230113
	ОАО «Максфарм», Россия	ЛП 001915-291112
	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия	ЛП 001493-100212
	ОАО «Кировская фармацевтическая фабрика», Россия	ЛСР-008607/09-281009
	ООО «Ватхэм-Фармация», Россия	ФСП 42-0298-4063-03
	ЗАО «ЯФФ», Россия	Р N002851/01-160512
	ЗАО «Ярославская фармфабрика», Россия	Р N002851/01-160512
	ООО «Камелия НПП», Россия	Р N002072/01-100908
	ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия	ЛСР-000475/09-270109
	ОАО «Дальхимфарм», Россия	Р N001518/01-180108
	ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия	ЛСР-002484/07-250814
	ЗАО «Ростовская фармфабрика», Россия	ЛС-001971
	ООО «Фармстандарт-Фитофарм-НН», Россия	ЛС-001827
ПЭЗ ГУП «Вилар», Россия	Р N003222/01	
«Элеутерококка сухой» (сырье растительное-экстракт сухой) экстракт	ООО «Хармс», Россия	ЛСР-004059/09-250509
«Элеутерококка» (таблетки покрытые оболочкой) экстракт	ЗАО «Вифитех», Россия	ЛС-002397-150512
Янтарная кислота		
«Цитофлавин®» (раствор для внутривенного введения)	ООО НТФФ «Полисан», Россия	Р N003135/01-011009
«Цитофлавин» (таблетки покрытые кишечнорастворимой оболочкой)	ООО НТФФ «Полисан», Россия	ЛС-001767
«Лимонтар®» (таблетки растворимые)	ООО МНПК «Биотики», Россия	ФСП 42-0031-07
«Янтарь-антитокс®» (таблетки)	ООО «Томская фармацевтическая фабрика», Россия	ФСП 42-0597-6371-05
«Янтарная кислота» (субстанция-порошок)	ОАО «Марбиофарм», Россия	Р N002810/01
	ООО «Полисинтез», Россия	Р N002810/01

Результаты научного поиска выявили отсутствие на сегодняшний день безопасной и эффективной комбинации ЛС для коррекции десинхроноза, что показывает высокую необходимость проведения разработки таковых в рамках данной работы.

В данной работе, для разработки безопасной и эффективной ЛФ были использованы: экстракт элеутерококка колючего сухой, экстракт падуба парагвайского сухой и субстанция янтарной кислоты.

Из-за отсутствия на мировом фармацевтическом рынке стандартизированного экстракта падуба парагвайского, параллельной задачей создания ЛФ было разработать схему получения сухого экстракта путем экстрагирования из сырья растительного происхождения.

1.2 Способы экстрагирования растительного сырья

С целью повышения выхода БАВ используют различные методы экстракции и экстрагенты [13, 43, 87]. Эффективность процесса экстракции в значительной степени обусловлена выбором технологии экстрагирования и экстрагента [88, 121]. На степень извлечения влияет: выбранный экстрагент, его концентрация и соотношение, температура, при которой проходит экстракция, размер частиц сырья и продолжительность экстрагирования [83, 88, 165].

Согласно Национальной Фармакопее Аргентины, литературным данным, а также в соответствии с инструкцией производителя, наиболее распространенным методом получения извлечения из листьев падуба парагвайского является метод мацерации водой [150, 154, 156, 161, 166, 177, 180, 187, 213, 214, 229, 243, 245], где стандартными параметрами приняты: экстрагент – вода; температура экстракции – 40-100°C; время – 15-60 минут; соотношение сырье:экстрагент – 1-1,5:10. Однако, в своей работе R.M.C. Pinto показал, что данный метод имеет ряд недостатков: неполнота экстракции действующих веществ, завышенное содержание балластных веществ и т.д [213].

Для интенсификации процесса экстрагирования, рядом исследователей, при получении экстракта падуба парагвайского, были использованы различные

модификации методов экстрагирования с использованием различных экстрагентов: гексан, толуол, дихлорметан, этилацетат, ацетон, метанол, этанол, CO₂-экстрагирование, а также экстрагирование с использованием ультразвука, ускоренная экстракция растворителем (метод ASE®) и сверхкритическая флюидная экстракция [171, 185]. Однако, по данным литературы, эти методы имеют ряд существенных недостатков: высокое энергопотребление, пожаро- и взрывоопасность, сложные технологические схемы, усложненный метод очистки вытяжек, дороговизна оборудования и т.д [39; 239].

На фармацевтических заводах в рамках изготовления жидких экстрактов, вне зависимости от варианта используемого сырья (листья, корни, цветки, кора, плоды), используется доступный и простой в проведении процесс экстрагирования метод противоточного экстрагирования в батарее экстракторов при соотношении фаз 1:1 [6, 105, 114, 123]. Недостатками этой технологии является: трудность при производстве небольших партий и время очистки батареи экстракторов. На результативность указанного выше метода экстрагирования оказывает воздействие количество этапов экстракции, сочетание фаз и измельченность сырья [134, 246]. Поскольку, противоточное движение фаз при экстракции обеспечивает большую степень извлечения, чем прямоточное, то применяется именно противоток. Данный метод привлекателен обеспечением получения концентрированных вытяжек, хорошей воспроизводимостью, гибкой аппаратурно-технологической схемой и невысоким потреблением электроэнергии [202, 248].

1.3 Современные аспекты технологического процесса капсулирования лекарственных средств

За последние несколько лет в фармацевтической индустрии технология капсулонаполнения подверглась значительным изменениям. Эта технология, представляющая интерес в широком спектре научных и промышленных областей, от фармацевтики до сельского хозяйства. В настоящее время капсулы – одна из самых популярных и универсальных лекарственных форм [112, 159]. Более

технологически и экономически выгодные в производстве, чем другие твердые пероральные лекарственные формы, капсулы оказывают меньше побочных эффектов, требуют меньшего количества вспомогательных веществ (далее ВВ), имеют высокую точность дозирования и т.д. [32, 120].

В зависимости от средней вместимости, капсулы выпускают восьми размеров [144]:

Номер	000	00	0	1	2	3	4	5
Средняя вместимость капсулы, мл	1,37	0,95	0,68	0,5	0,37	0,3	0,21	0,13

По отдельности или в различных комбинациях в капсулы могут быть введены порошки, гранулы, микрокапсулы, микродраже, таблетки (покрытые и непокрытые оболочками), маленькие желатиновые капсулы, пасты и жидкости с высокой вязкостью (рисунок 5) [1, 203].

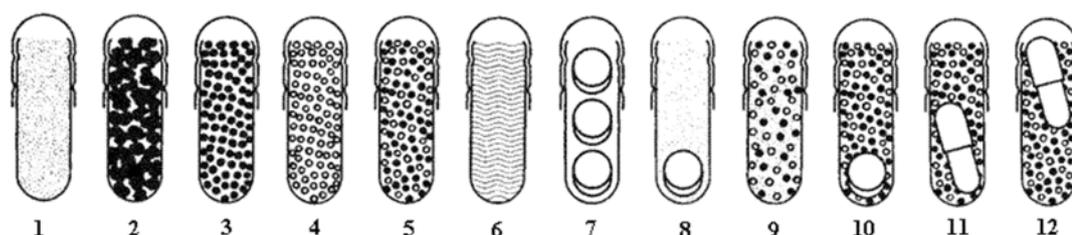


Рисунок 5 - Виды капсулирования различных веществ. 1 – порошок; 2 – гранулы; 3 – микродраже; 4 – микрокапсулы с жидким или газообразным ядром; 5 – комбинация микрокапсул; 6 – паста; 7 – таблетки; 8 – комбинация порошка и таблетки; 9 – комбинация порошка и микрокапсул; 10 – комбинация микрокапсул и таблетки; 11 – комбинация микрокапсул и желатиновой капсулы; 12 – комбинация микрокапсул, порошка и желатиновой капсулы

Одной из задач фармацевтической технологии, является разработка современных методов гранулирования многокомпонентных субстанций, содержащих сухие экстракты.

Растительные экстракты сухие зачастую обладают неудовлетворительными физико-химическими и технологическими свойствами (низкой сыпучестью и прессуемостью, наличием пылевидной фракции, высокой гигроскопичностью) [137]. Дополнительной проблемой является то, что экстракты, полученные из сырья, обладающего растительным происхождением, могут не поддаваться смешиванию, так как составные порошки могут сегрегировать из-за различных

плотностей отдельных порошков [78]. Для решения данной проблемы используется процесс гранулирования и введения веществ (например, микрокристаллическая целлюлоза), которые страхуют частицы одинакового размера и плотности [4, 232].

Гранулирование – важнейшая методика улучшения качества и свойств твердых веществ и ключевым этапом в фармацевтической, пищевой и химической промышленности. В одних случаях гранулы могут являться конечным продуктом, тогда как в других гранулы могут использоваться в качестве промежуточного продукта с последующими стадиями измельчения, покрытия и прессования.

Согласно анализу научных публикаций, в настоящее время ведется разработка новых и модификация традиционных методов гранулирования [221, 224, 226, 235].

Технология ВГ (влажное гранулирование) была разработана с целью получения более текучих и плотных гранулятов. Методы влажной грануляции могут включать гранулирование в псевдооживленном слое, ротогрануляцию, грануляцию с высоким усилием сдвига и двухшнековую экструзионную грануляцию [132, 238].

К преимуществам влажного гранулирования относятся:

- Образовавшиеся гранулы при ВГ имеют более сферическую форму и обладают лучшими свойствами текучести чем порошки;
- Улучшенная прессуемость порошков, полученных в результате ВГ, позволяет использовать низкое давление во время прессования. Это снижает износ оборудования и, таким образом, увеличивает срок ее службы;
- В процессе ВГ преимущественно используются стандартные ВВ и, следовательно, процесс не зависит от включения особых видов ВВ;
- ВГ обеспечивает однородность содержимого, особенно для растворимых лекарственных средств с низкой дозой;
- Способ улучшает скорость растворения плохо растворимых лекарственных средств за счет придания гидрофильных свойств на

поверхности гранул;

- ВГ предотвращает сегрегацию компонентов однородной порошковой смеси;
- ВГ снижает уровень пыли, присутствующей во время производственного процесса, тем самым снижая вероятность перекрестного загрязнения и риска для рабочих.

Принимая во внимание преимущества ВГ, следует отметить перспективность этой технологии при работе с сухими растительными экстрактами.

Лекарственные вещества (субстанции, сухие экстракты) и ВВ при ВГ добавляются в определенном порядке. Процесс проходит в несколько этапов: измельчение, увлажнение, протирание, сушка и обработка гранул. Успех процесса зависит от выбора и порядка, в котором добавляются ингредиенты препарата [237].

В стадии увлажнения, сухие вещества смешивают со связующим веществом в порошковую форму. На этой стадии, на смесь при перемешивании в виде мелких капель распыляется некоторое количество жидкости. Жидкость увлажняет смесь и приводит связующее вещество к липкости, которое заставляет частицы сформировывать влажные агломераты.

После стадии увлажнения, при смешивании, добавляют влагораспределяющее вещество, которое распределяет большую часть избыточной воды.

Затем добавляют остальные вещества улучшающие технологические характеристики гранулята (противоприлипающие, пленкообразователи, смазывающие, скользящие), что приводит к образованию сухого и сыпучего гранулята [237].

Примеры веществ, успешно использованных для ВГ сухих растительных экстрактов и кристаллических веществ, приведены в таблице 4 [3, 46, 132, 221, 231].

Таблица 4 - Вещества, применяемые в технологии ВГ сухих растительных экстрактов и кристаллических веществ

Назначение	Состав/торговое название
Влагоадсорбирующие, сухие связующие	Микрокристаллическая целлюлоза (<i>Avicel PH 200, Vivapur[®] 12/102, Emcocel[®], Microcel[®] MC 12/102/122/500</i>); Двуводный вторичный кислый фосфат кальция (<i>Emcopress[®]</i>); Соплимер винилпирролидона и ванилацетата (<i>Plasdone[®]S – 630</i>); Мальтодекстрин (<i>Glucidex[®]IT</i>); Крахмал кукурузный частично гидролизованый (<i>Lycatab[®]C</i>)
Разбавители	Маннит (<i>Parteck[®]M, Pearlitol[®]DC (300, 400, 500 DC), Pearlitol[®]SD (100, 200 SD) 100 SD</i>); Лактозы моногидрат 85% и кукурузный крахмал 15% (<i>Starlac[®], Primalac[®] 40, CapsuLac[®] 60, Sachelac[®] 80, SpheroLac[®] 100</i>); Агломераты лактозы (<i>таблеттоза 70/80/100</i>); Сахароза (<i>Compri Sugar[®], Surinerts[®]</i>); Сорбит (<i>Parteck[®]SI, Neosorb[®] P 60 W (P 100T, P 20/60 или P 30/60)</i>)
Дезинтегранты	Натрия гликолят крахмала (<i>Primojel[®], Glycolys[®], Explotab[®], Vivastar[®]</i>); Кросповидон (<i>Kollidon[®]CL</i>); Кросскармеллоза натрия (<i>Primellose[®], Solutab[®], Vivasol[®]</i>); Соевый полисахарид (<i>Emcosoy[®]</i>)
Скользкие, влагораспределяющие	Коллоидный кремния диоксид (<i>Aerosil[®] 200 Pharma</i>); Кремния диоксид (<i>Syloid[®] 244 FP</i>)
Связующие	Прежелатинизированный крахмал (<i>Lycatab[®]PGS</i>); Гидролизованый крахмал (<i>Lycatab[®]DSH</i>)

Широкий ассортимент ВВ, используемых при ВГ, расширяет технологические возможности создания качественного гранулята из сухих растительных экстрактов, отвечающего всем существующим требованиям.

Выводы к главе 1

1. Адаптогены растительного происхождения – это весьма важные корректирующие средства для устранения десинхронозов у тех людей, у которых наблюдаются нарушения биоритмов в рамках трансмеридианных перелетов, а также у тех, кто работает вахтовым методом. Помимо этого, такие адаптогены подходят для лиц преклонного возраста, у которых наблюдаются общие изменения биологических процессов (возрастной десинхроноз). Адаптогены растительного происхождения способствуют повышению адаптации при быстрой смене часовых поясов, при работе, связанной с ежедневными умственными и нервными перегрузками, при тяжелых физических нагрузках.

2. Анализируя научную, патентную литературу можно сделать вывод о возможности использования средств природного происхождения, а именно, препаратов элеутерококка колючего, падуба парагвайского в сочетании с метаболическим средством для создания ЛФ для коррекции патологических состояний связанных с десинхронозом.

3. Экстракционные препараты являются наиболее приемлемым вариантом для увеличения точности дозирования и рациональной переработки ценного лекарственного растительного сырья.

4. Анализ номенклатуры ЛС, которые выведены на рынок России, указывает на то, что действующие вещества, которые были выбраны, можно встретить в различных лекарственных средствах, что свидетельствует об актуальности их использования, однако, полная комбинация этих действующих веществ ранее исследована не была.

5. Технология ВГ является перспективной в технологии получения фармацевтических препаратов. ВГ позволяет минимизировать объем гранулирующей жидкости, исключить стадию сушки, а также не требует сложной аппаратурно-технологической схемы производства.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Листья 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 экстракт сухой, субстанция-экстракт сухой (ООО «Хармс», Россия), № ЛСР-004059/09 (в соответствии с ФС 2.5.0053.15);

Янтарная кислота, субстанция-порошок (ОАО «Марбиофарм», Россия), Р N000493/01;

Мелаксен[®], таблетки покрытые оболочкой (Юнифарм Инк, США), № П N015325/01.

Копии паспортов качества на сырье представлены в Приложении И.

2.2 Вспомогательные вещества

Все реактивы квалификации не ниже – «чистые для анализа» (ч.д.а.):

Люминол ($C_8H_7N_3O_2$) – 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион (Fluka, Чешская республика), CAS № 521-31-3

АБАП ($[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \cdot 2HCl$) – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (Sigma-Aldrich, Германия), CAS № 2997-92-4

Трис (гидроксиметил) аминометан ($C_4H_{11}NO_3$) – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Sigma-Aldrich, Германия) CAS № 77-86-1

Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты дигидрат ($C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$) (Sigma-Aldrich, Германия) CAS № 6381-92-6

Тролокс ($C_{14}H_{18}O_4$) – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхромо-2-карбоновая кислота (Sigma-Aldrich, Германия), CAS № 53188-07-1

Вода очищенная, ФС.2.2.0020.15

Натрия гидроксид (NaOH) 5%, разведённый водой (1:1), CAS №1310-73-2

Глицерин, разведённый водой (1:1), CAS № 56-81-5

- 7
Раствор железоммонийных квасцов ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), CAS №7783-83-7
- Концентрированная хлористоводородная кислота (HCl), CAS № 7647-01-0
- Реактив Драгендорфа (раствор висмута нитрата основного и калия йодида с добавлением уксусной кислоты)
- Йода р-р (0,1 н), CAS № 7553-56-2
- Система растворителей эфир – ацетон – 25% р-р аммиака (40:20:1)
- Раствор алюминия хлорида (III) (AlCl_3) 3%, CAS №7446-70-0
- Хлороформ (ООО Компонент-Реактив, Россия), CAS № 67-66-3
- Кроскармеллоза натрия (Vivasol[®]GF (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия)), CAS№ 74811-65-7
- Силифицированная микрокристаллическая целлюлоза (PROSOLVSMCC[®] 90 LM (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия)), CAS № 9004-34-6 + 7631-86-9
- Натрия крахмал гликолят (Vivastar[®]P (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия)), CAS№ 9063-38-1
- Кремния диоксид коллоидный гранулированный (AEROPERL[®] 300 Pharma (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия)), CAS№ 112 945-52-5 (бывш. 7631-86-9)
- Микрокристаллическая целлюлоза (VIVAPUR[®] 101/103 (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия)), CAS № 9004-34-6
- Крахмал кукурузный частично прежелатинизированный (LYCATAB[®] C (Roquette, Франция))
- Крахмал кукурузный полностью прежелатинизированный (LYCATAB[®] PGS (Roquette, Франция))
- β-циклодекстрин (KLEPTOSE[®] (Roquette, Франция)), CAS № 7585-39-9
- Поливинилпирролидон (ПВП) (Kollidon[®] (BASF, Германия)), CAS № 9003-39-8
- Спирт этиловый (ООО «СпиртТорг»,Россия), CAS № 64-17-5
- Лактоза (Panreac, Испания), CAS № 63-42-3

2.3 Стандартные вещества

Теофиллин, субстанция-порошок, содержание теофиллина $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich[®], Германия, серия 125K0661, годен до 05.2016, CAS №58-55-9;

Теобромин, субстанция-порошок, содержание теобромина $\geq 99,0\%$, (Sigma-Aldrich[®], Германия), серия ВСВН4839V, годен до 09.2016 г, CAS №83-67-0;

Кверцетин, субстанция-порошок, содержание кверцетина $\geq 99,5\%$, (Фитопанацея, Россия), серия 236957, годен до 12.2016 г, CAS № 117-39-5;

Кофеин, субстанция-порошок, содержание теобромина $\geq 98,0\%$, (Sigma-Aldrich[®], Германия), серия SLBC8045V, годен до 09.2016 г, CAS №58-08-2;

Рутин, субстанция-порошок, содержание рутина $\geq 98,5\%$, (Фитопанацея, Россия), серия 078961, годен до 12.2016 г, CAS № 153-18-4;

Янтарная кислота, субстанция-порошок, содержание янтарной кислоты $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich[®], Германия), серия SFGL1109K, годен до 08.2016 г, CAS №110-15-6;

Элеутерозид В, субстанция-порошок, содержание элеутерозида В $\geq 98,0\%$, (ChromoDex, США) серия 00019561-010, годен до 10.2016, CAS № 118-34-3;

Элеутерозид Е, субстанция-порошок, содержание элеутерозида Е $\geq 98,0\%$, (ChromoDex, США) серия 0007601-010 годен до 10.2016, CAS №39432-56-9.

2.4 Оборудование и посуда

Анализатор влажности МВ-35(Ohaus, США)

Ареометр АНТ-2 (Контур-М, Россия)

Бумажные фильтры, ГОСТ 12026

Вакуум-выпарной аппарат Heidolph laborota 4000 (Heidolph, Германия)

Вакуумный насос V-700 (BUCHI, Германия)

Весы аналитические ES 225 SMDR (Precisa Швейцария)

Весы электронные (CAS ED-H, КНР)

Вибровискозиметр SV-10 синусоидальный (A&D Company Limited, Япония)

Вибросито CISA RP 200N (Cisa, Испания) с набором сит с диаметром

отверстий 1,0; 0,5; 0,25; 0,10 мм

Видеосистема для автономной съёмки HC-X810 (Panasonic, Япония)

Водяная баня (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург)

Воронки, ГОСТ 25336-82

Встряхиватель типа вортекс (ELMI, Латвийская республика)

Делительная воронка, ГОСТ 25336-82

Устройства для дозирования переменного объема Eppendorf 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл (Eppendorf, Германия)

Жидкостный хроматограф Agilent 1200, оснащенный масс-спектрометрическим детектором MS 6120 (Agilent Technologies, США)

Иглы препаровальные

Колбы со шлифом, ГОСТ 1770-74

Концентратор Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Германия)

Лабораторный миксер гранулятор GLATT TDG (Glatt, Германия)

Лабораторный фен HT0139 (LLG, Украина)

Лампы дневного света TL40 (Beurer, Германия)

Мерные колбы, ГОСТ 1770-74

Микроскоп Celestron Deluxe с LCD экраном с объективами 4×, 10×, 20× и 40× (Celestron, США)

Микрошприцы для нанесения проб «АГАТ» М-10 и М-10Н (Лабораторные Технологии, Россия)

Морозильник для плазмы (Sanyo, Япония)

Набор стёкол покровных, ГОСТ 6672-75

Набор стекол предметных, ГОСТ 9284-75

Одноразовые контейнеры для контролируемого замораживания и размораживания Celsius-Pak (Sartorius Stedim Biotech, Германия)

Пипетки, ГОСТ 29227-91

Пластинки фирмы (Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Германия)

Пробирки вакуумные с ЭДТА VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия)

Пробирки, ГОСТ 1770-74

Пульверизатор для опрыскивания хроматографических пластинок, (Merck, Германия)

Рефрактометр FT2030 (Leitenberger, Германия)

pH-метр Seven Multi (Mettler Toledo, Швейцария)

Машина для наполнения капсул, ручная (ACG – Pam MF-30, Индия)

Система водоподготовки Millipore, Milli-Q Advantage A10, (Millipore, Франция)

Система для автоматизированного компьютерного анализа поведения животных Noldus EthoVision XT (Noldus Information Technology, Нидерланды)

Скальпель, ГОСТ 21240-89

Спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия)

Стаканы химические, ГОСТ 25336-82

Стеклянные хроматографические камеры (Merck, Германия)

Сушильный шкаф-термостат Binder FED 53 (Binder, Германия)

Тестирующее устройство для определения уровня сыпучести гранулированного материала Erweka GTB (ERWEKA, Германия)

Тестер контроля распадаемости таблеток Erweka ZT 322 (ERWEKA, Германия)

Тестирующее устройств для определения насыпной плотности порошков и гранулятов SVM 221 (ERWEKA, Германия)

Универсальная мельница M-20 (IKA, Германия)

Установка «открытое поле», диаметр арены 97 см, высота стенок 42 см, диаметр отверстий в полу 2 см (ООО «НПК Открытая Наука», Россия)

УФ-спектрофотометр Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США)

Центрифуга Elmi CM-6M (скорость вращения до 3500 об/мин) (ElmiLtd., Латвийская республика)

Центрифуга Eppendorf 5415D (Eppendorf Германия)

Цилиндр для теста «Вынужденное плавание» с диаметром 20 см, высотой 45 см (ООО «НПК Открытая Наука», Россия)

Цифровой люксметр DT-1309 (СЕМ, КНР)

Шкаф сушильно-стерилизационный, (ШСС – 80 п, УХЛ 4,2, Россия) ТУ 64-1-909-80

Эппендорфы (Biosan, Латвийская республика)

2.5 Приготовление растворов

Приготовление раствора люминола

Рабочий раствор люминола готовили на 50 мМ боратном буфере, рН 10.0. Концентрация люминола в рабочем растворе - 5 мМ. Для приготовления 5 мМ раствора люминола отвешивали 177,16 мг вещества на 100 мл боратного буфера. Для полного растворения люминола к навеске добавляли 1-2 гранулы NaOH. Затем доводили рН раствора до 10,0. Приготовленный раствор люминола разливали по эппендорфам (по 1 мл на 1 эппендорф – 40 проб.). Рабочий раствор люминола хранили в холодильнике в замороженном состоянии при температуре - 30°C. Перед работой раствор люминола размораживали, перемешивали и хранили в темноте при комнатной температуре на протяжении всего эксперимента [147].

Приготовление раствора АБАП

Рабочий раствор АБАП готовили на бидистиллированной воде непосредственно перед экспериментом. Концентрация АБАП в рабочем растворе – 50 мМ (13,56 мг/мл). АБАП отвешивали из расчета 27,12-33,9 мг, что позволяло приготовить 2-2,5 мл раствора АБАП (40-50 проб). Приготовленный раствор АБАП помещали в пластиковую пробирку с пробкой и хранили в емкости со льдом в холодильнике в течение всего эксперимента [147].

Приготовление буферного раствора

В качестве основной среды использовали 0,1 М Трис-HCl буфер, содержащий 0,1 М KCl, рН 8,14. При температуре 37°C указанный буферный раствор имеет рН 8.0 [147].

Приготовление раствора ЭДТА

В методике использовали 10 мМ раствор ЭДТА, приготовленного на 0,1 М Трис-HCl буфере, содержащем 0,1 М KCl, рН 8,14

Приготовление раствора тролокса

В настоящей методике в качестве антиоксиданта сравнения применяли тролокс (Мв. = 250,29 г/моль). Основной (маточный) раствор тролокса готовили следующим образом. Для этого отвешивали 10 мг тролокса (точная навеска 10,0116 мг). Добавляли к этой навеске 5 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и перемешивали раствор на магнитной мешалке до полного растворения тролокса. В качестве посуды использовали стеклянный бюкс с притертой крышкой. Затем к раствору тролокса в ДМСО добавляли 15 мл 0,1 М Трис-НСl буфера, содержащего 0,1 М КСl, рН 8,14. Смесь хорошо перемешивали и разливали по пробиркам, вместимостью 1,5 мл (по 400 мкл на 1 пробирку). Концентрация тролокса в полученном растворе составляет 2 мМ. Основной раствор тролокса хранят в холодильнике в замороженном состоянии при температуре - 30°C около 6 месяцев [147].

Перед работой основной раствор тролокса размораживали и хорошо перемешивали. Для приготовления рабочего раствора тролокса в пластиковый флакон (на 5 мл) наливали 1975 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера, содержащего 0,1 М КСl, рН 8,14 и добавляли 25 мкл основного раствора тролокса (всегда одной и той же микропипеткой). Полученный рабочий раствор тролокса хорошо перемешивали. Концентрация тролокса в этом растворе составляла 25 мкМ. Рабочий раствор тролокса готовили непосредственно перед измерением ингибирующего эффекта этого антиоксиданта на хемилюминесценцию системы АБАП-люминол. Рабочий раствор тролокса хранили в холодильнике в течение эксперимента (5-10°C) [147].

Концентрация ДМСО в основном и рабочем растворах тролокса составляла соответственно 3,53 М и 44 мМ [147].

Приготовление раствора железо-аммонийных квасцов

30 г квасцов железо-аммониевых растворяли в 100 мл воды, доведенной до состояния кипения. Полученный раствор отфильтровывали. К раствору добавляли азотную кислоту в разведенном состоянии. Причем делалось это до того момента, пока коричневый цвет не становился желто-зеленым.

Приготовление 1% раствора желатина в 10% растворе натрия хлорида

1 г мелко измельченного желатина помещают в фарфоровую чашечку, заливают 20 мл воды на полчаса-час для набухания. К набухшему желатину добавляют остальные 80 мл воды и подвергают нагреву при помощи водяной бани, устанавливая температуру от 40 до 600 градусов до того момента, пока он не растворится. После этого субстанцию разводят 10%-ным раствором хлористого натрия в отношении 1:5. Полученный раствор отфильтровывали.

Приготовление раствора хлорида железа

В 60 мл нагретой до 50–70°C воду порциями, помещали 20 г хлорного железа. Полученный раствор отфильтровывали.

Приготовление 1% спиртового раствора щелочи

В химическом стакан помещали 98 мл 96% этилового спирта, затем в нем растворяли 1 г металлического натрия; по окончании растворения натрия добавляли 2 мл воды.

Приготовление реактива Драгендорфа (раствор висмута нитрата основного и калия йодида с добавлением уксусной кислоты)

0,85 г нитрата висмута подвергали растворению в сорока миллилитрах воды с добавлением десяти миллилитров уксусной кислоты. После этого наступал этап изготовления раствора йодида калия в воде – восемь граа первого вещества и двадцать миллилитров второго. Осуществляли смешивание равных количеств растворов, которые были приготовлены. После этого десять миллилитров смеси разводили ста миллилитрами воды с добавлением двадцати миллилитров уксусной кислоты.

Приготовление 3 % раствора алюминия хлорида

3,0 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75) подвергали растворению в 40 мл 95 % этанола. Для работы использовалась колба, вместимость которой составляла 100 мл. Объем раствора подлежал доведению до метки при помощи 96 % этанола.

Приготовление раствора ГСО рутина

Примерно 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина требуется высушить, для чего используется температура от 130 до 135 градусов Цельсия. Время – три часа.

После этого полученное вещество подвергали растворению в 85 мл 95% спирта, вместимость колбы – 100 мл. При этом осуществлялось нагревание на водяной бане. Затем емкость следовало охладить, произвести количественное перемещение содержимого в колбу, вместимость которой составляла 100 мл. Количество раствора доливали спиртом до метки, все смешивали (ФС 42-2508-87).

Приготовление раствора ГСО кверцетина

Раствор ГСО кверцетина делали также, как и раствор (ФС 42-1325-94).

2.6 Методы исследования

2.6.1 Определение показателей качества сырья листьев падуба парагвайского

Установление подлинности, степени измельченности и содержания примесей

Осуществлялось по ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Для того, чтобы установить, насколько подлинным является сырье растительного происхождения, представленное в средней пробе, осуществляли забор аналитической пробы, масса которой составляла 10 граммов. После этого ее помещали на сухую и чистую, гладкую поверхность для того, чтобы установить наличие в ней составных элементов в соответствии с их внешним видом. Для этого их изучали визуально с применением увеличительного стекла (10х).

Макроскопические признаки сырья листья падуба парагвайского устанавливали и описывали согласно требованиям ГФ XIV - ОФС.1.5.1.0003.15 «Листья» [39].

Сырье растительного происхождения исследовалось микроскопически по ГФ XIV - ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [39].

Устьичный индекс определяли по формуле:

$$\text{Устьичный индекс} = \frac{100 * S}{E + S}, \text{ где}$$

S – число устьиц на 1 мм² поверхности листа;

E – количество клеток эпидермальной категории, также и трихом, на указанной площади листа.

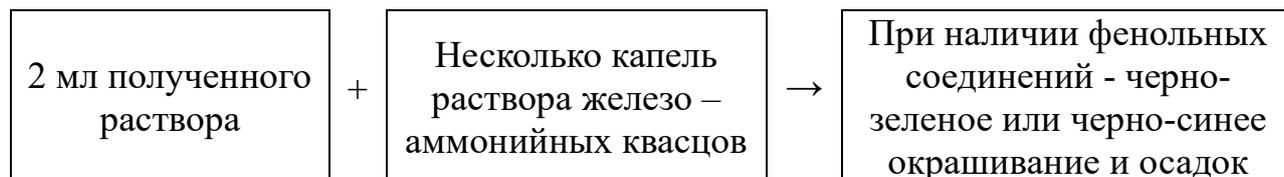
Делали не менее 10 определений и рассчитывали среднее значение [189].

Установление подлинности сырья осуществляли посредством проведения качественных реакций:

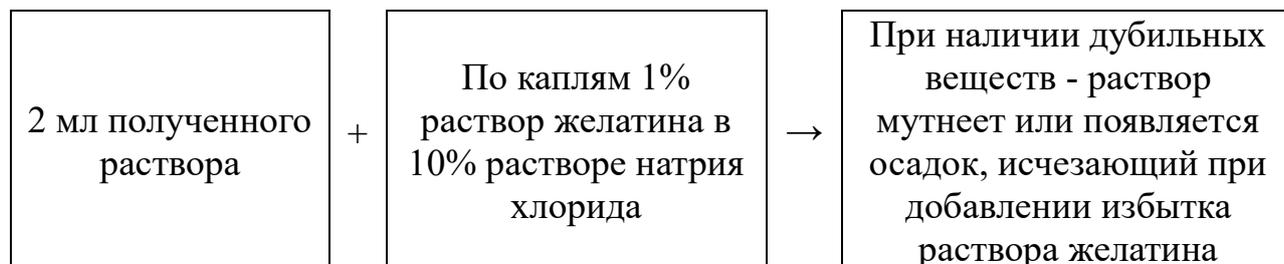
Полифенольные окисляемые вещества (дубильные вещества)

Чтобы установить наличие дубильных веществ в сырье, его в количестве пяти граммов заливали нагретой водой – 100 мл. После этого осуществлялось его кипячение на протяжении пяти минут. Затем следовала фильтрация, после чего:

1) Реакция с железом – аммонийными квасцами:



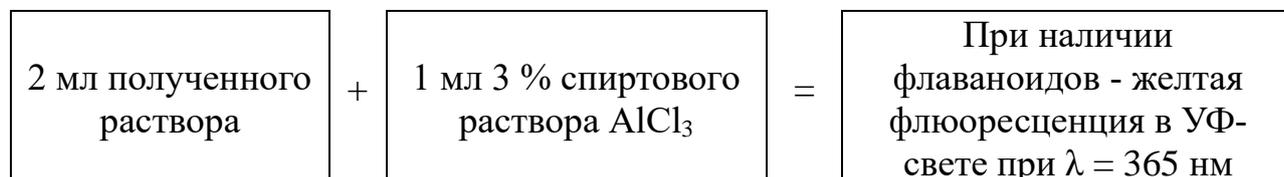
2) Реакция с раствором натрия хлорида:



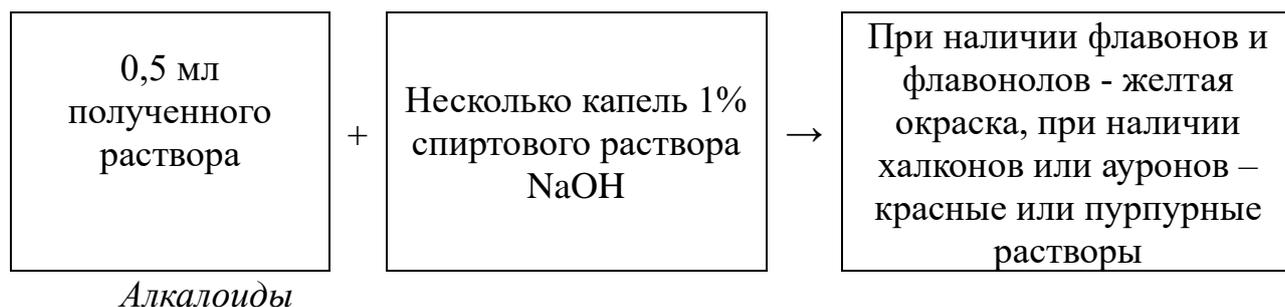
Флавоноиды

В колбу, которая имеет шлиф, помещали навеску сырья. Колба емкостью 100 мл. Затем сюда же наливали 30 мл этанола 70%. Затем наступал черед экстракции на водяной бане, оснащенной обратным холодильником. Когда процесс завершился, готовую смесь охлаждали, подвергали фильтрации, далее:

1) Реакция с раствором AlCl₃:

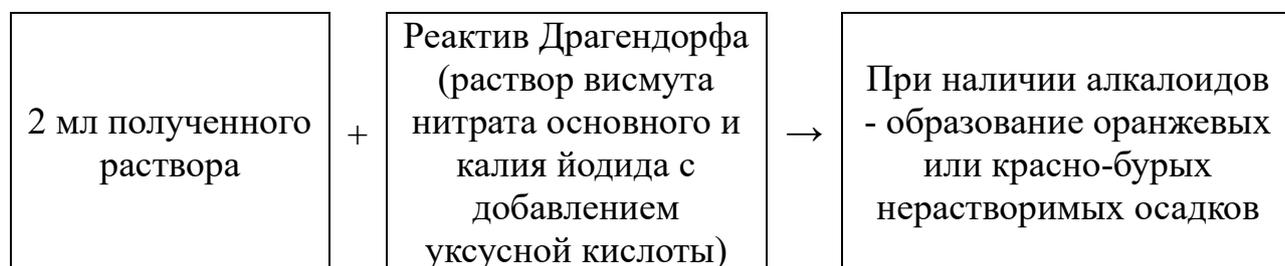


2) Реакция с раствором NaOH:

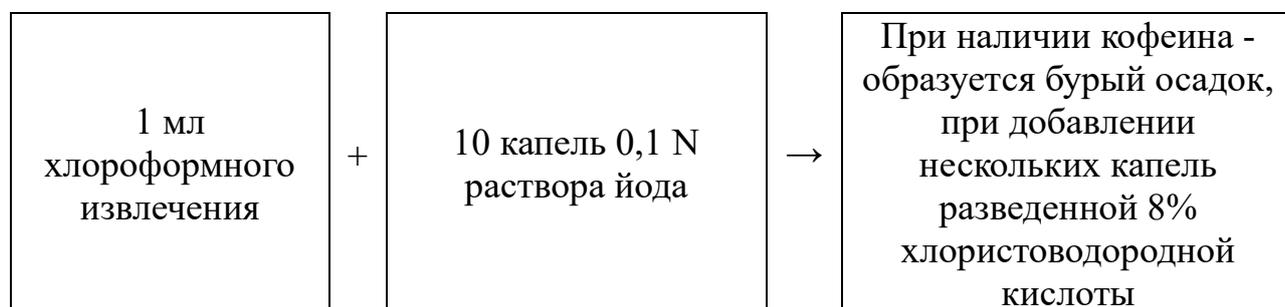


Для извлечения применялась 1% уксусная кислота, сочетание- 1:10. Осуществлялось кипячение на протяжении пяти минут. После этого проводилась фильтрация.

1) Реакция с реактивом Драгендорфа:



2) Реакция с раствором йода:

Тонкослойная хроматография (ТСХ) пуриновых алкалоидов

Качественный состав основных действующих веществ (кофеин, теобромин, теофиллин) из полученных извлечений определяли методом ТСХ из подкисленного до рН 4 экстракта падуба парагвайского жидкого/сухого. Хроматографирование проводили в круглых камерах в системе растворителей эфир-ацетон-25 % р-р аммиака (40:20:1). Время насыщения камеры – 40 минут. Для проведения ТСХ использовали силикагель (пластинки фирмы «Merck» DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Германия).

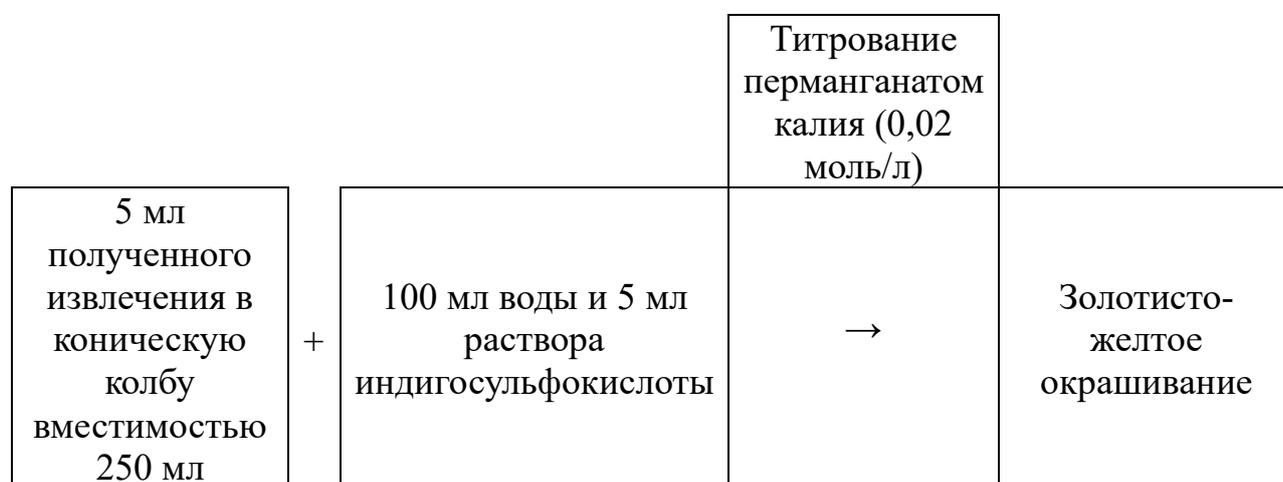
От линии старта до нижней грани пластинки – один сантиметр, от боковых граней пластинки до того места, куда наносилась проба – аналогичное состояние.

Между соседними пробами – более сантиметра, фронт прохождения системы растворителей 10 см.

По завершении хроматографического разделения пластинку обрабатывали 0,1 н раствором йода, а затем через несколько минут - смесью равных объемов 96 %-го этилового спирта и 25 %-го раствора хлороводородной кислоты [71].

Методика определения содержания дубильных веществ в листьях и черешках падуба парагвайского

На кафедре фармацевтического естествознания Первого МГМУ им. И.М.Сеченова была разработана и апробирована методика, где количество извлечения, взятого для титрования, воды и индикатора сокращали в 5 раз.



Одновременно осуществлялся опыт для контроля.

Количество дубильных веществ в процентном соотношении, если пересчитывать на сырье в абсолютно сухом состоянии, подлежало определению в соответствии с выражением

$$X = \frac{(V - V_1) * 0,004157 * 50 * 100 * 100}{m * 5 * (100 - W)}$$

Методика установления количественного составляющего суммы флавоноидов, если пересчитывать на рутин, в листьях и черешках падуба парагвайского

Для установления содержания флавоноидов в количественном соотношении применялась методика ФС.2.5.0015.15 «Трава зверобоя» [39].

Для определения количественного выражения суммы флавоноидов, если проводить пересчет на рутин, а также на сырье в абсолютно сухом состоянии, в

количественном выражении, использовалось выражение:

$$X = \frac{m_0 * D * 100 * 100 * 100}{m * D_0 * 100 * (100 - W)}, \text{ где}$$

D-оптическая плотность раствора, подлежащего исследованию;

D₀- оптическая плотность ГСО рутина/кверцетина;

m - масса сырья, г;

m₀ - масса ГСО рутина (кверцетина), г;

W - потеря в массе после проведения сушки, %.

Установление степени измельченности

Осуществлялось по ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» путем просеивания навески сырья через сита с диаметром отверстий 7,0; 5,0; 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мм.

Установление коэффициента поглощения сырья, коэффициент формирования внутреннего сока, коэффициент роста объема при растворении экстрактивных веществ

Для определения коэффициента поглощения применялось выражение

$$K_{\text{погл}} = \frac{V - a}{G}, \text{ где}$$

V – объем экстрагента, который участвовал в экстракции, см³;

a – объем извлечения, см³;

G – масса сырья, г.

Выражение для определения коэффициента формирования внутреннего сока:

$$K = \frac{a[100x(f - d) + G(x + W)]}{100xGx\rho_n}$$

Выражение для определения коэффициента роста объема, который наблюдается в рамках растворения экстракционных веществ:

$$Z = \frac{V_1 * P_1 + b - c}{b * P_1}$$

P₁ – плотность растворителя, подлежащая установлению посредством

фармакопейных алкоголетрических таблиц. Причем это делается в соответствии с концентрацией спирта в растворителе, являющейся известной, в процентах в соответствии с массой P_p . Выражение для определения P_p :

$$P_p = \frac{100 * f * P}{G * W + 100 * f}, \text{ где}$$

G – масса сырья, г;

W – потеря в массе в процессе высушивания, %;

x – концентрация экстрактивных веществ в сырье, %;

f – масса экстрагента, который принимается для обработки, г;

V – объем экстрагента, используемого для экстракции, см^3 ;

ρ_n – плотность экстрагента, $\text{г}/\text{см}^3$;

P – концентрация спирта в экстракте, % по массе;

P_p – концентрация спирта в растворяющем веществе;

a – объем полученного извлечения, см^3 ;

d – масса полученного извлечения, г;

c – масса извлечения, подлежащего исследованию, г;

V_1 – объем извлечения, подлежащего исследованию, см^3 ;

b – масса остатка в сухом состоянии, г;

K_n – коэффициент поглощения сырья, $\text{см}^3/\text{г}$;

K – коэффициент формирования внутреннего сока, $\text{см}^3/\text{г}$;

Z – коэффициент увеличения объема, которое наблюдается в рамках растворения экстрактивных веществ, $\text{г}/\text{см}^3$.

Наличие примесей в сырье, имеющем растительное происхождение

Субстанции, которые поступали с верхнего и нижнего сит, располагали на очищенную гладкую поверхность. Затем при помощи пинцета осуществляли выделение примесей:

- Элементы сырья, которые потеряли окраску, которая соответствовала определенному виду сырья.

- Иные элементы растения, которые не находятся в соответствии с существующим описанием сырья.

- Примеси органического происхождения.
- Примеси минерального происхождения.

Также необходимо было проанализировать наличие или отсутствие амбарных вредителей.

Осуществлялось взвешивание каждого из типов примесей, погрешность при этом составляла $\pm 0,05$ г.

Выражение для определения каждого из типов примеси в процентах:

$$X = m_1 * 100 / m_2, \text{ где}$$

m_1 – масса примеси в граммах;

m_2 – масса аналитической пробы сырья, выраженная в граммах.

Наличие суммы экстрактивных веществ

Для установления наличия данных веществ использовалась гравиметрическая методика, приведенная в ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [39].

Выражение для расчета наличия экстрактивных веществ в процентах в пересчете на сырье в абсолютно сухом состоянии:

$$X = \frac{m * 100 * 100 * V}{a * (100 - W) * 25}, \text{ где}$$

m – масса остатка в сухом состоянии, г;

a – навеска лекарственного сырья, обладающего растительным происхождением, г;

W – уровень влажности сырья, %;

V – объем экстрагента, который применяется в рамках однократной обработки сырья, мл.

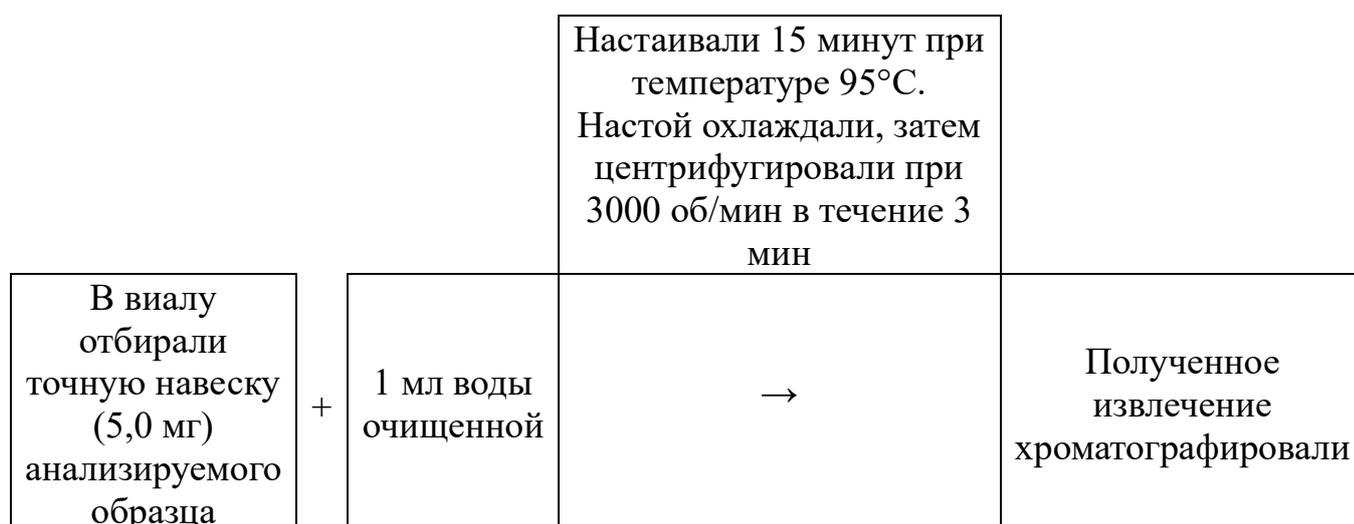
Наличие золы общей и золы, которая не подлежит растворению в хлористоводородной кислоте

Установление наличие общей золы осуществлялось по методу, приведенному в ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая». Для установления наличия золы, которая не подлежит растворению в хлористоводородной кислоте

осуществляли по ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте» [39].

2.6.1.1 Методика количественного определения кофеина, теобромина и теофиллина из сырья листьев падуба парагвайского

Методика пробоподготовки



Условия хроматографирования

Условия хроматографирования на жидкостном хроматографе Breeze с УФ-детектором 2487 (Waters, США) представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Условия хроматографирования кофеина, теобромина и теофиллина из сырья листьев падуба парагвайского

Кофеин	
Колонка	4,6×150 мм
Сорбент	Symmetry C-18 с размером частиц 5мкм
T _{термостат}	30°C
Длина волны:	275 нм
Мобильная фаза	0,1% раствор трифторуксусная кислота в воде (А), метанол (В)
Скорость потока	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл
Теобромин и теофиллин	
Колонка	4,6×150 мм
Сорбент	Symmetry C-18 с размером частиц 5мкм
T _{термостат}	30°C
Длина волны:	275 нм
Мобильная фаза	0.1% трифторуксусная кислота в воде (А), ацетонетрил (В), скорость потока 1,40 мл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл.
Скорость потока	1.40 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл

Режим элюирования представлен в таблице 6.

Таблица 6 - Режимы элюирования методом ВЭЖХ при определении при определении кофеина, теобромина и теофиллина в сырье падуба парагвайского

Кофеин		
Время, мин	Раствор А, %	Раствор В, %
0,0	60	40
15,0	0	100
20	60	40
Теобромин и теофиллин		
0,0	97,0	3,0
4,0	97,0	3,0
6,0	85,0	15,0
15,0	80,0	20,0
25,0	40,0	60,0
30,0	97,0	3,0

Для проведения калибровки применялся стандарт вещества, подлежащего исследованию. Произведено приготовление растворов с содержанием кофеина, теобромина и теофиллина 5 мг в 10 мл мобильной фазы А. Чтобы сформировать график калибровки для вещества, подлежащего исследованию, в инжектор в последовательном режиме подлежали введению пять, десять, пятнадцать и двадцать мкл растворов стандартного типа, с помощью которого проводилось количественное определение в образцах. Хроматограмма сырья падуба парагвайского, полученная для кофеина, теобромина и теофиллина представлена на рисунке 6.

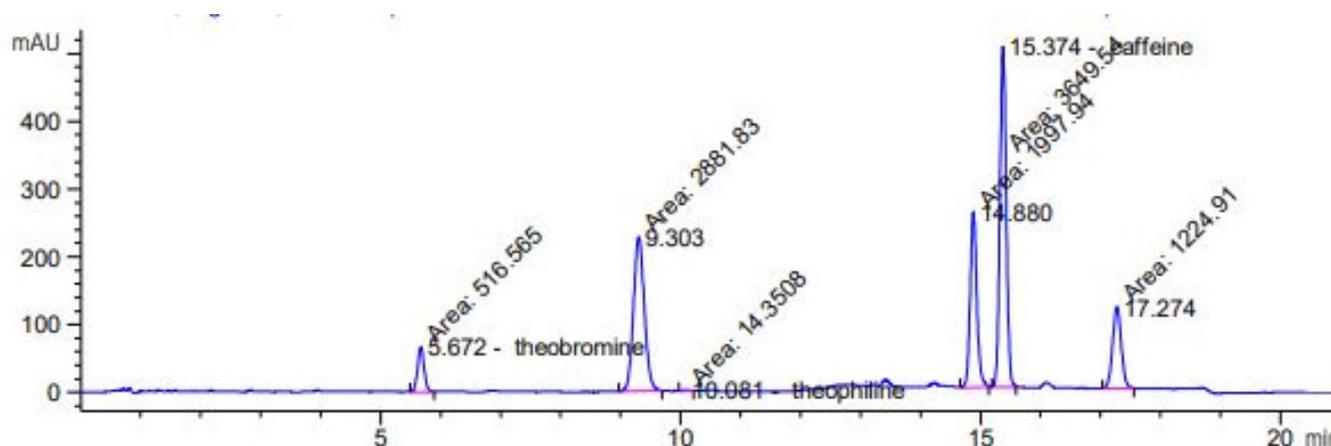


Рисунок 6 - Хроматограмма экстракта из сырья падуба парагвайского, содержащего кофеин, теобромин и теофиллин

2.6.2 Методы определения технологических параметров сухих экстрактов и гранулятов

Сухие экстракты и грануляты оценивали по ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» по таким параметрам, как: потеря в массе при высушивании, уровень сыпучести, угол естественного откоса, свободная насыпная плотность, предельная плотность, тяжелые металлы, остаточные органические растворители [39].

Форма и размер частиц

Определение размеров и морфологии частиц проводили на электронном микроскопе Celestron Deluxe с LCD экраном.

Определение влажности

Для работы использовалось сушильное оборудование - шкаф-термостат Binder FED 53 (Binder, Германия).

Выражение для определения уровня влажности сырья в процентах:

$$W = (m - m_1) * 100 / m, \text{ где}$$

m – масса сырья, которое оно имело до процесса сушки, в граммах;

m_1 – масса сырья, которое оно имело после процесса сушки, в граммах.

Для осуществления экспресс-исследования уровня влажности экстрактов и гранулятов применялось устройство для исследования влажности OHAUS MB-35. Работа велась при температуре - 105°C. Уровень точности измерения влажности – 0,01 %.

Установление насыпной плотности экстрактов и гранулятов в сухом состоянии

Выражение для расчета насыпной массы:

$$H_m = \frac{(m - m_1) * 100}{m}, \text{ где}$$

M – масса сырья, г;

V – объем, который занимает сырье.

Установление уровня предельной насыпной плотности

Для определения уровня предельной насыпной плотности экстрактов и гранулятов в сухом состоянии использовалось устройство SVM 121 (Erweka,

Германия).

$$\rho_{\max} = \frac{m}{V}, \text{ где}$$

ρ_{\max} – объемная плотность, кг/м³;

V – объем гранулята в цилиндре, который он занимает после процесса уплотнения (встряхивания), м³;

m – масса гранулята, кг.

Установление уровня сыпучести

Исследование проведено при помощи устройства Erweka GTB (Erweka, Германия).

Выражение для установление уровня сыпучести материала:

$$V = \frac{m}{t_{\text{cp}}}, \text{ где}$$

m – масса навески, г;

t_{cp} – среднее время, необходимое для истечения навески, с.

Установление параметров угла естественного откоса

Определить данные параметры для экстрактов и гранулятов в сухом состоянии осуществлялось на тестирующем устройстве, предназначенном для установления уровня сыпучести материала в гранулах, когда они высыпаются из воронки на горизонтальную плоскость (ERWEKA GTB, Германия). Степень сыпучести присваивали исходя из данных в таблице 7.

Таблица 7 - Степень сыпучести порошков и соответствующий угол естественного откоса

Степень сыпучести	Угол естественного откоса, градус
Очень хорошая	25-30
Хорошая	31-35
Удовлетворительная	36-45
Неудовлетворительная (требуется дополнительное перемешивание или вибрация)	46-55
Плохая	56-65
Очень плохая	Более 66

Индексы Hausner и Carr

Индексы определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» и математических расчётов.

Формулы расчета индексов:

$$\text{индекс Carr (J)} \quad J = \frac{(p_y - p) * 100}{p_y}$$

$$\text{индекс Hausner (H)} \quad H = \frac{p_y}{p}, \text{ где}$$

p_y – насыпная плотность, наблюдаемая после уплотнения,

p – насыпная плотность, наблюдаемая до уплотнения.

Гранулометрический состав

Для определения использовалась специализированная установка, предназначенная для проведения ситового исследования Cisa – вибросито RT 200N. Осуществилось просеивание гранулята, подлежащего исследованию на обратной стороне сит, которые имели отверстия диаметром 1,0; 0,5; 0,25; 0,1 мм. Исследование осуществлялось по ГФ XIV ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ». Размер порошка определяли исходя из данных таблицы 8 [39].

Таблица 8 - Классификация порошков в соответствии с их измельченностью

Наименование порошка	Размер отверстий (мкм) сит, через которые проходит	
	не менее 95 %	не более 40 %
Очень крупный порошок	-	1400
Крупный порошок	1400	355
Среднемелкий порошок	355	180
Мелкий порошок	180	125
Очень мелкий порошок	125	90

Определение смачиваемости

В химический стакан вместимостью 400 мл с налитыми в него 100 мл воды, подвергнутой очистке, при температурах 20, 30, 40, 50, 60 и 70°C, помещали 10 г растительного сырья/сухого экстракта. Продолжительность полного погружения частиц продукта в воду служило мерой его смачиваемости.

Тест считался оконченым, когда частицы полностью намокали. Время намокания фиксировалось в секундах. Экстракт считается быстрорастворимым, если он смачивается в течении 15 секунд [75].

Оценка качества исследуемой ЛФ

При оценке качества капсул в соответствии с ОФС.1.4.1.0005.18 «Капсулы» определяли: однородность массы, дозирования, уровень распадаемости, растворение [39].

Средняя масса содержимого капсулы

В соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0009.15. Критерий приемлимости рассчитывали в соответствии с вышеуказанным нормативом. Отклонения от средних масс как неоткрытых капсул, так и содержимого капсул должно составлять $\pm 7,5\%$.

Подлинность

Для обнаружения янтарной кислоты использовали качественную реакцию с резорцином [38]. Для обнаружения кофеина, теобромина и теофиллина и элеутерозида В использовали метод ТСХ [71, 113].

Распадаемость

Определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», на тестере контроля распадаемости таблеток ZT 322 (Erweka, Германия).

Растворение

Для работы использовался ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».

Условия работы устройства типа «Лопастная мешалка» (Erweka DT 827/1000 ЛН, Швейцария) представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Условия работы лопастной мешалки (Erweka DT 827/1000 ЛН, Швейцария) в тесте растворения

Среда растворения	вода очищенная
Объем	500 мл
Температура	$37 \pm 0,5^\circ\text{C}$
Скорость вращения мешалки	100 об/мин
Временные точки	10, 15, 30, 45 и 60 мин.

Отбор проб осуществлялся спустя 10, 15, 30, 45 и 60 минут после того, как было начато исследование. Количество отбираемого вещества составляло 5 мл. Осуществлялось исследование процента высвобождения янтарной кислоты, для чего использовался метод ВЭЖХ.

Выражение для установления количества действующих веществ, которые были высвобождены из капсул:

$$Z = \frac{C}{C_{\max}} * 100\%, \text{ где}$$

C – концентрация веществ, которые поступили в среду, г/л;

C_{\max} – количество вещества в среде, которое является максимально возможным, г/л.

Определение сроков стабильности ЛФ СКЭП при естественных условиях

Осуществляется по ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и Временной инструкцией И-42-2-82 [31, 39] методом долгосрочных испытаний.

2.6.2.1 Методика количественного определения янтарной кислоты

Методика пробоподготовки

Содержимое одной капсулы (580 мг) добавляли в воду, подвергнутую очистке. Для работы использовалась колба, объем которой составил 100 мл. Раствор, который был получен, доводился водой до метки с одновременным перемешиванием. Далее осуществлялась фильтрация, для которой применяется мембранный фильтр, диаметр пор которого составляет 0,5 мкр. Фильтрат в количестве 1 мл располагался в колбе, объем которой составлял 10 мл, затем туда доливалась до метки вода с одновременным перемешиванием. Так изготавливался раствор для количественного определения.

Условия хроматографирования

Условия хроматографирования с применением хроматографа жидкостного типа Agilent 1200 оснащенным фотодиодноматричным детектором с длиной волны 210 нм (Agilent Technologies, США) представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Условия хроматографирования янтарной кислоты

Колонка	4,0 мм × 25 см
Сорбент	Размер частиц 5 мкм
Мобильная фаза	0,6% раствор хлорной кислоты в воде при pH 2,1
Скорость потока	1 мл/мин

Калибровку проводили по стандарту анализируемого вещества. Точную

навеску около 15 мг янтарной кислоты растворяли в подвижной фазе, для работы использовалась колба, объем которой составил 100 мл. Далее доливалась вода, подвергнутая очистке, до метки, с одновременным перемешиванием. В колбу на 10 мл помещали 1 мл раствора, который был получен. До метки доливалась вода, подвергнутая очистке. При этом можно было получить раствор, который является стандартным, концентрация которого является известной и составляет 0,015 мг/мл.

В хроматограф вводили равные объёмы (около 20 мкл) стандартного раствора и испытуемого раствора для количественного определения, регистрировали хроматограммы и определяли площади основных пиков. Относительное время удерживания для янтарной кислоты составляет около 1,88. Пример хроматограммы субстанции-порошка янтарной кислоты, полученный для янтарной кислоты представлен на рисунке 7.

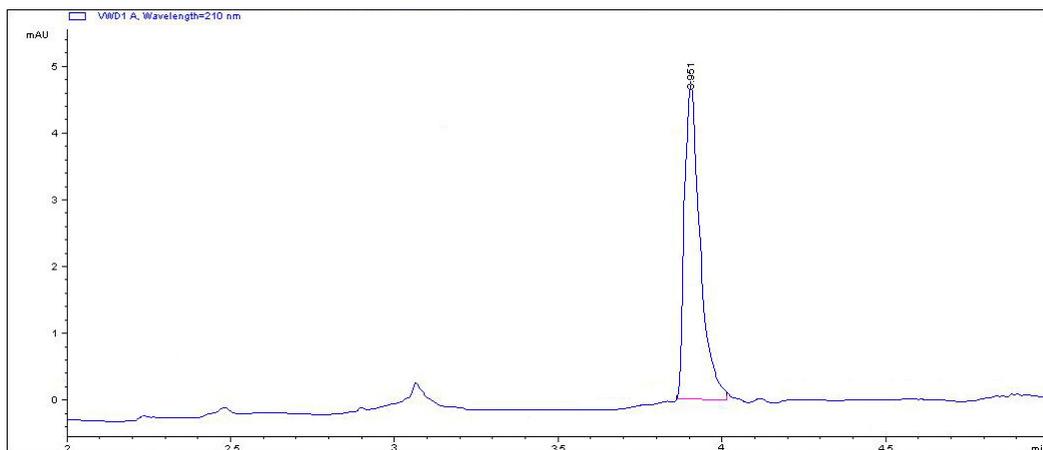


Рисунок 7 - Хроматограмма субстанции-порошка янтарной кислоты

Содержание (мг) янтарной кислоты в одной капсуле вычисляли по формуле:

$$X = 1000 \times C \times (r_U/r_S), \text{ где}$$

C – концентрация, в мг/мл, янтарной кислоты CO в стандартном растворе;

r_U и r_S – площади пиков янтарной кислоты в испытуемом растворе для количественного определения и в стандартном растворе соответственно.

2.6.2.2 Методика количественного определения элеутерозидов В и Е

Методика пробоподготовки

Приготовление растворов элеутерозидов, которые являются стандартными, осуществлялось посредством растворения 5 мг в колбах, объем которых составляет 25 мл. Для работы использовалась смесь метанола и воды деионизированной в пропорции 70 к 30. Необходимо было встряхивать смесь до того, как она полностью растворится. Для доведения объема до метки использовался аналогичный растворитель. Данная концентрация составила 200 мкг/мл. После этого использовали разбавление для того, чтобы получить концентрации 80 мкг/мл, 40 мкг/мл, 20 мкг/мл, 8 мкг/мл.

Условия хроматографирования

Для определения в количественном выражении использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200, оснащенный масс-спектрометрическим детектором MS 6120 (Agilent Technologies, США). Условия хроматографирования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Условия хроматографирования элеутерозидов В и Е с целью количественного определения

Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18 4,6 мм X50 мм
Сорбент	Размер частиц 1,8 мкм
Т _{термостат}	23°C
Мобильная фаза	0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде/ацетонитрил (2:98), предварительно подвергнутая фильтрации и дегазации на устройстве, предназначенном для фильтрования под вакуумом
Скорость потока	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл
Обработка данных	Chem Station (ver. B.03.01-SR1), Agilent Technologies, США
Время хроматографирования	2 мин
Тип ионизации	ESI + APCI (электроспрей при атмосферном давлении)
Режим сканирования	SIM (по характеристическому пику m/z 785,3 для элеутерозида Е и 416,10 для элеутерозида В)
Время удерживания	1,2 для элеутерозида Е и 1,4 для элеутерозида В
Скорость потока	1.40 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл

Хроматограммы экстракта элеутерококка колючего сухого, полученные для элеутерозидов В и Е представлен на рисунках 8 и 9.

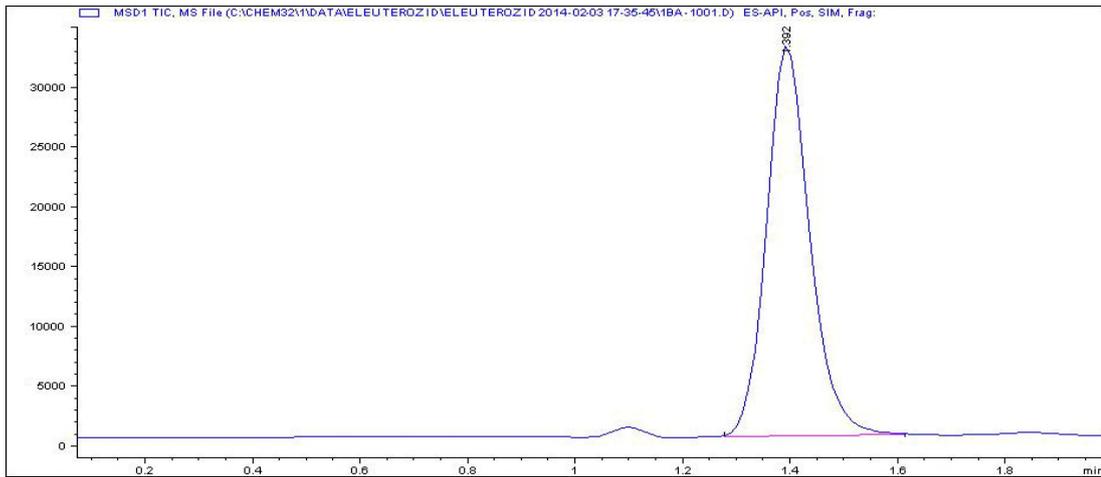


Рисунок 8 - Пример хроматограммы экстракта, полученный в условиях хроматографирования для элеутерозида В

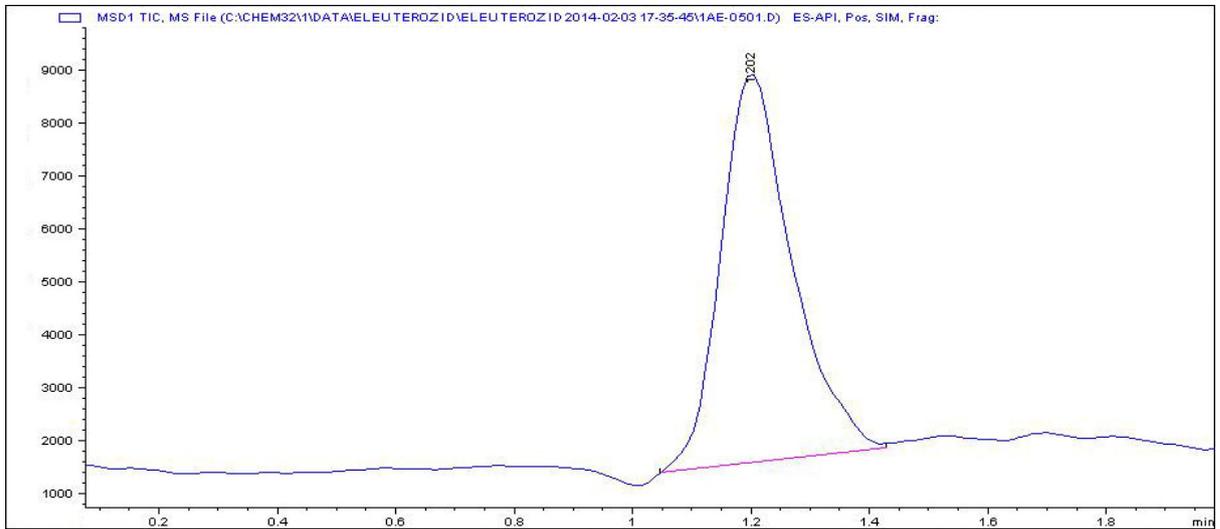
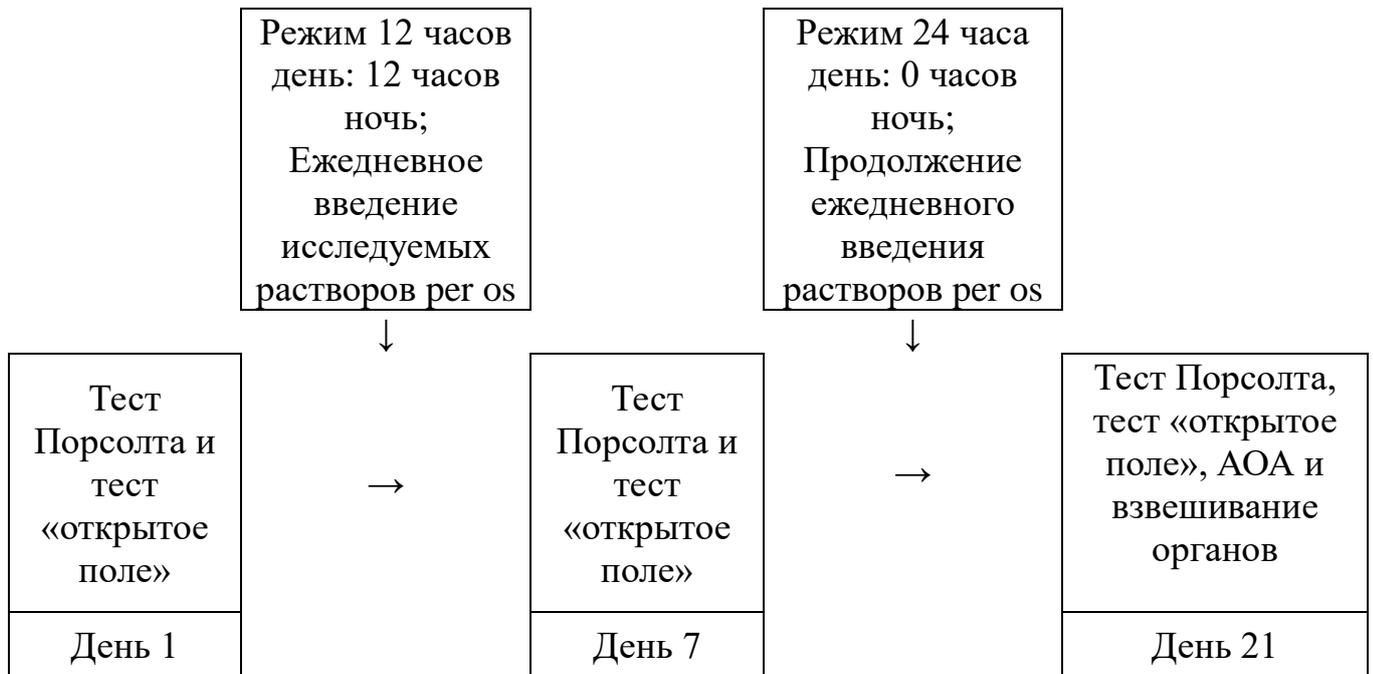


Рисунок 9 - Пример хроматограммы экстракта, полученный в условиях хроматографирования для элеутерозида Е

2.6.3 Определение эффективности ЛФ СКЭП

Моделирование светового десинхроноза осуществляли по разработанной авторами методике [18].



Оценку адаптогенных эффектов проводили по классической методике теста Порсолта (вынужденного плавания) на 1-ый, 7-ой и 21-ый дни эксперимента.

Поведение крыс (двигательная и исследовательская активность) исследовалась в тесте «открытое поле».

Стандартно для проведения доклинических испытаний результативности возможных препаратов применяются представители отряда грызунов. В нормативных документах содержится рекомендация применять крыс в роли одних из самых оптимальных тестовых систем для того, чтобы провести доклинические исследования возможных препаратов.

Изучение поведенческих реакций в тесте «открытое поле»

«Открытым полем» называли арену, диаметр которой составлял девяносто семь сантиметров. Высота стенок составляла сорок два сантиметра. В полу были проделаны отверстия, диаметр которых составлял два сантиметра. Для изготовления арены применялся пластик белого цвета. Пол арены расчерчивался на три ряда секторов, каждый из которых имел одинаковую площадь. По этой причине в качестве единицы перемещения было удобно использовать один сектор. Для освещения применялась лампа, мощность которой составила 100 Вт. Она размещалась на высоте полутора метров от дна арены. Перед тем, как начать исследование, животных помещали на пятнадцать минут в затемненную камеру из

пластика, размер которой составлял 300×150×100 мм, имелись отверстия для дыхания. Проведение всех процедур тестирования осуществлялось с 12.00 до 17.00.

Крысы помещались в центральной части «Открытого поля», после этого фиксировали время, когда животное покидало центральный квадрат. Осуществлялся подсчет количества пересеченных квадратов в качестве характеристики вертикальной двигательной активности. Также фиксации подлежало число обследований отверстий, которые были сделаны в полу арены, время, требуемое на груминг, количество дефекаций, уринаций, осуществляли расчет их суммы.

Изучение актопротекторного действия в тесте «вынужденное плавание»

Тестирование с вынужденным плаванием демонстрирует чрезвычайное положение для животного. Оно позволяет установить особенности депрессивно-подобного поведения [64].

В рамках тестирования крыс сначала взвешивали. К хвосту привешивался груз, вес которого составлял 7,5% от массы тела. После этого животных помещали в индивидуальные цилиндры, в которых содержалась дегазированная вода. Диаметр цилиндра составлял сорок сантиметров, температура воды – двадцать четыре градуса по Цельсию. В момент, когда животное опускалось в воду, включали секундомер. В качестве параметра прекращения плавания считалось погружение животного на дно и отказ всплывать. Тогда животное доставали из воды и сушили. Регистрация поведенческих особенностей осуществлялась посредством цифровой камеры, которая располагалась на расстоянии восьмидесяти сантиметров над ареной. Камера подключалась к компьютеру.

2.6.3.1 Определение антиоксидантной активности в плазме крови

Исследование антиоксидантной активности (АОА) крови проводили по методике инициирования реакций свободнорадикального окисления красителя люминола в присутствии 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП) [137].

2.6.4 Статистическая обработка результатов

Приведенные в тексте и таблицах значения выражаются в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Значение «р» $< 0,05$ считалось статистически значимым. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась с использованием программы Statistica 10 (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА ПАДУБА ПАРАГВАЙСКОГО СУХОГО

Получить цельное сырье не представлялось возможным, поэтому для исследования использовали сырье, приобретенное в торговой сети. Для анализа использовалось сырье, фасованное в пачки марки «DON LUCAS», сертифицированного INAL – Instituto Nacional De Alimentos (Национальный Институт Питания), масса сырья в 1 пачке - 500 г, партия № 08278, годен до 04.2019. Сырье листья падуба парагвайского прошло следующие испытания: внешний вид, параметры органолептической категории, общая зола, уровень влажности, зола, которая не подлежит растворению в хлористоводородной кислоте, экстрактивные вещества, наличие кофеина, иные элементы сырья, которые не находятся в соответствии с описанием, количество листьев (сухих, сломанных и пыль), масса (объем) содержимого упаковки, органическая примесь, микроскопическое исследование.

3.1 Определение подлинности и показателей качества сырья

Внешние признаки

Листья падуба парагвайского имели вид частей листьев, форма и размеры различные. Также в наличии были черешки, которые проходили через сито, имеющее отверстия 5 мм. Цвет желто-зеленый, бурый, буро-зеленый (рисунок 10). Запах характерный, терпкий. Вкус горький.



Рисунок 10 - Внешний вид сбора листьев падуба парагвайского

Микроскопическое описание

Проведено микроскопическое изучение листа с поверхности в ходе которого были выявлены следующие анатомо-диагностические признаки: верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток, которые имеют прямые стенки с равномерными утолщениями (рисунок 11). Для эпидермиса верхней стороны листа характерна лучистая морщинистость кутикулы (рисунок 12). Также на верхнем эпидермисе листа были обнаружены вместилища с бурым содержимым (рисунок 12), округлые вместилища с бесцветным содержимым (рисунок 13), друзы оксалата кальция (рисунок 14), воздухоносные полости (рисунок 15) и кольчатые сосуды по жилке (рисунок 16). Для эпидермиса нижней стороны листа характерна продольная морщинистость кутикулы (рисунок 17). Устьица находятся только на нижнем эпидермисе. Устьичный комплекс парацитного типа. Устьица крупные, овальные, окружены чечевицеобразными устьичными клетками (рисунок 17). Устьичный индекс – 7,13%. Также были обнаружены вместилища с бурым содержимым (рисунок 18).

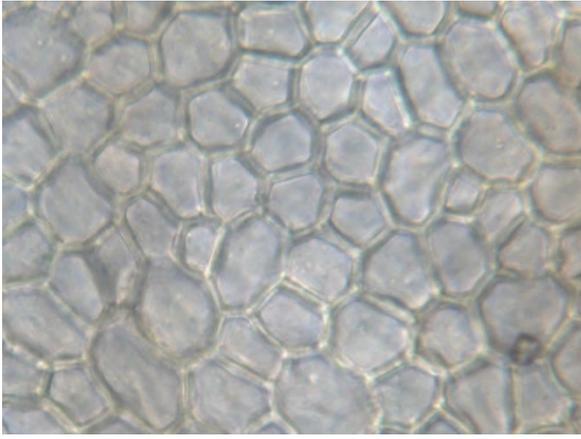


Рисунок 11 - Микропрепарат листа с поверхности. Верхний эпидермис падуба парагвайского: многоугольная форма клеток верхнего эпидермиса. Прямые равномерно утолщенные стенки клеток (УВ. 400х)

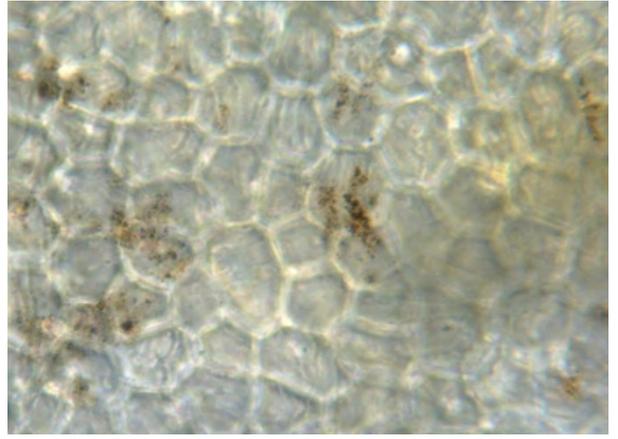


Рисунок 12 - Микропрепарат листа с поверхности. Верхний эпидермис падуба парагвайского: а – лучистая морщинистость кутикулы; б – вместилища с бурым содержимым (УВ. 400х)

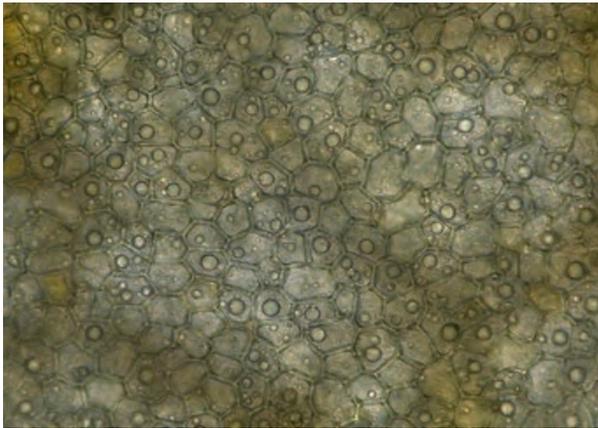


Рисунок 13 - Микропрепарат листа с поверхности. Верхний эпидермис падуба парагвайского: а – клетки эпидермиса с маслянным содержимым (УВ. 200х)

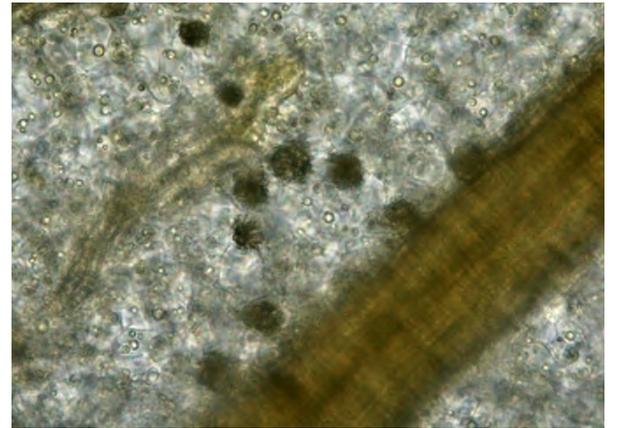


Рисунок 14 - Микропрепарат листа с поверхности. Верхний эпидермис падуба парагвайского: а – друзы оксалата кальция в мезофиле листа (УВ. 400х)

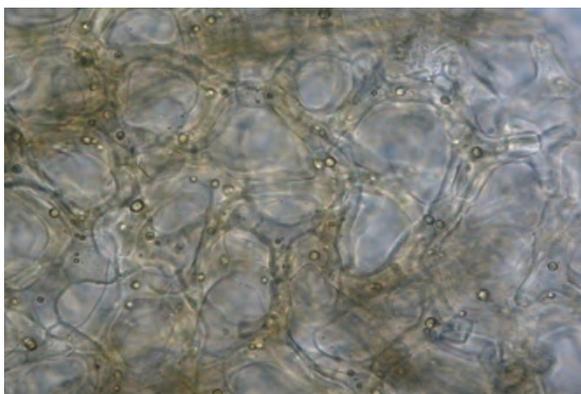


Рисунок 15 - Микропрепарат листа с поверхности. Верхний эпидермис падуба парагвайского: а – губчатый мезофил с воздухоносными полостями (УВ. 400х)

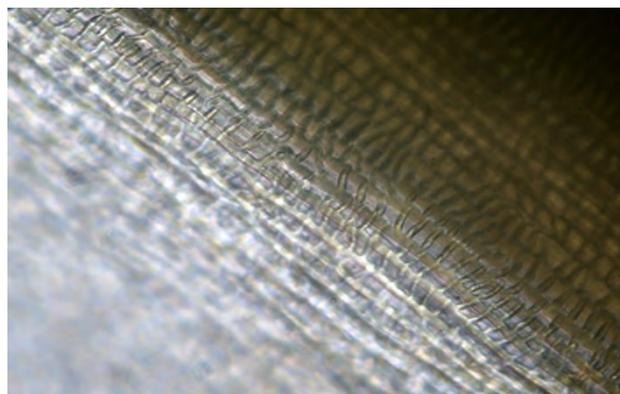


Рисунок 16 - Микропрепарат измельченного листа падуба парагвайского: а – проводящие элементы жилки (кольчатые сосуды) (УВ. 400х)



Рисунок 17 - Микропрепарат листа с поверхности. Нижний эпидермис падуба парагвайского: а – продольная морщинистость кутикулы; б – парацитные овальные устьица с чечевицевидными устьичными клетками (УВ. 400х)

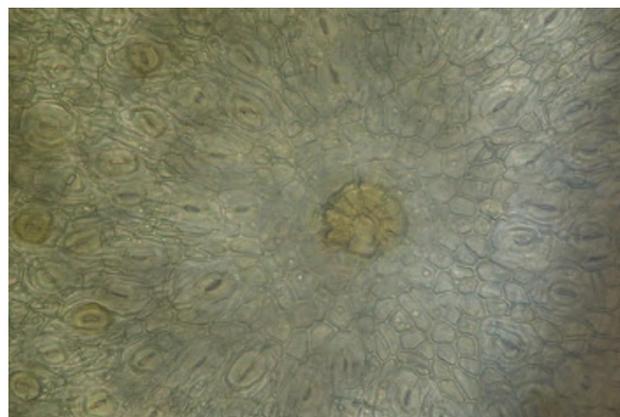


Рисунок 18 - Микропрепарат листа с поверхности. Нижний эпидермис падуба парагвайского: а – вместилища с бурым содержимым (УВ. 200х)

Ситовой анализ

Для установления размера частиц измельченного сырья листьев падуба парагвайского (100 г) использовался набор сит с размерами ячеек: 7,0, 5,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,2 и менее 0,2 мм.

Таблица 12 - Результаты ситового анализа измельченного сырья падуба парагвайского

Размер ячейки сита	Сырье листья падуба парагвайского, %
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 7,0 мм	0,00
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 5,0 мм	0,17±0,05
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 2,0 мм	67,96±0,08
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 1,0 мм	28,94±0,07
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 0,5 мм	1,24±0,06
Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 0,2 мм	0,56±0,03
Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 0,2 мм	1,13±0,04

В соответствии с результатами, полученными в рамках исследования, установлено, что количество частиц в измельченном сырье падуба парагвайского, не способных проникать через сито, имеющее ячейки размером в пять миллиметров, не составляет более 1,17%. Для частиц, которые способны проходить через ситос ячейками 0,2 мм – показатель 1,13% (таблица 12).

Фитохимический анализ

Для фитохимического анализа, нами были проведены качественные реакции на наличие групп БАВ в соответствии с методами, которые являются общепринятыми, приведенными в главе 2.

Для подтверждения наличия основных групп БАВ использованы качественные реакции (таблица 13), а также метод ТСХ.

Таблица 13 – Результаты фитохимического исследования листьев падуба парагвайского

Качественная реакция, реактив	Дубильные вещества		Флавоноиды		Алкалоиды	
	$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$	1% раствор желатина в 10% растворе натрия хлорида	AlCl_3	1% спиртовой раствор щелочи	Реактив Драгендорфа	Раствор йода в кислой среде
Листья падуба парагвайского	Черно-зеленое окрашивание	Помутнение раствора	Желтая флюоресценция в УФ-свете при длине волны 365 нм	Желтое окрашивание	Кирпично-красный осадок	Бурый осадок

В соответствии с качественными реакциями, можно указать на наличие в сырье растительного происхождения основных групп БАВ, среди которых следует упомянуть флавоноиды, дубильные вещества, а также алкалоиды.

Также, нами был проведен хроматографический анализ состава пуриновых алкалоидов хлороформных извлечений из подкисленного до pH 4 настоя листьев падуба парагвайского. В качестве СО использовали растворы теofilлина, теобромина, кофеина в хлороформе.

Для выполнения проб использовались микрошприцы «АГАТ» М-10 и М-10Н. Работа выполнялась линейно, количество нанесенной пробы – по 4 мкл на стартовую линию, которая прочерчивается обычным карандашом. Линия наносится на пластину хроматографического типа, которая заблаговременно активирована в сушильном шкафу. Температура обработки пластины – 120°C, время обработки – 30 мин.

При анализе хроматограммы экстракта падуба парагвайского обнаружены зоны: с Rf 0,22 (фиолетовое окрашивание); 0,60 (фиолетовое окрашивание); 0,47 (фиолетовое окрашивание). По сравнению с Rf стандартных образцов на хроматограмме идентифицированы кофеин, теобромин и теofilлин (рисунок 19).

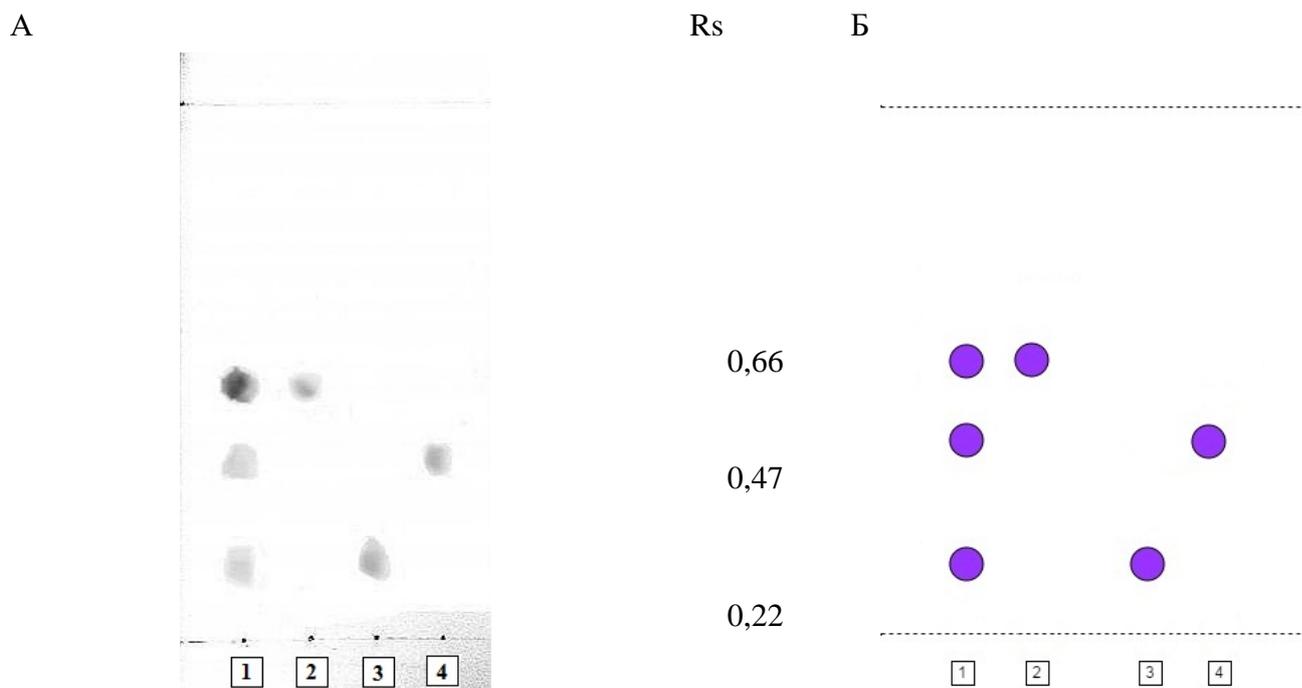


Рисунок 19 - Фотография (А) и схема (Б) хроматограммы хлороформных извлечений пуриновых алкалоидов из подкисленного экстракта падуба парагвайского после обработки хроматограммы 0,1 н раствором йода, смесью равных объемов 96 %-го этилового спирта и 25 %-го раствора хлороводородной кислоты: 1 – раствор экстракта падуба парагвайского в хлороформе; 2 – раствор СО кофеина в хлороформе; 3 – раствор СО теофиллина в хлороформе; 4 – раствор СО теобромина в хлороформе

Влажность

Осуществлялось измельчение пробы до размера элементов около 10 мм. Из пробы бралось три навески, масса каждой из них – от трех до пяти граммов. Погрешность взвешивания не превысила 0,01 г.

Средний показатель влажности сырья листьев падуба парагвайского равен $4,25 \pm 0,13$ %.

Экстрактивные вещества

С целью стандартизации сырья, а также установления оптимальных условий экстракции, позволяющих обеспечить максимальное истощение сырья, необходимы данные о наличии экстрактивных веществ в препарате. Предварительное исследование по изучению экстрагирующей способности различных экстрагентов (спирт этиловый различных концентраций (15-70%) и воды очищенной) на сырье листья падуба парагвайского установили экстрагент с

наилучшей экстрагирующей способностью (таблица 14) [39].

Таблица 14 - Результаты установления наличия суммы экстрактивных веществ (%), в зависимости от содержания экстрагента, ($M \pm m$) в листьях и черешках падуба парагвайского

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, $M \pm m$, %
Вода очищенная ($t 27 \pm 2^\circ\text{C}$)	$36,01 \pm 0,05$
Этиловый спирт 15%	$36,64 \pm 0,07$
Этиловый спирт 20%	$36,81 \pm 0,09$
Этиловый спирт 25%	$38,63 \pm 0,06$
Этиловый спирт 30%	$38,01 \pm 0,08$
Этиловый спирт 40%	$36,65 \pm 0,07$
Этиловый спирт 50%	$35,89 \pm 0,08$
Этиловый спирт 60%	$35,94 \pm 0,07$
Этиловый спирт 70%	$35,14 \pm 0,03$

Наиболее подходящим экстрагентом можно назвать спирт этиловый 25%. Выход экстрактивных веществ из листьев падуба парагвайского составил $38,63 \pm 0,16\%$. Наименьшее содержание экстрактивных веществ можно было увидеть при применении спирта этилового, содержание которого 70% - $35,14 \pm 0,03\%$.

Установление наличия дубильных веществ

Наличие дубильных веществ в настое устанавливали в соответствии с методикой, которая приведена в главе 2 «Материалы и методы».

В соответствии с исследованиями было установлено, что содержание дубильных веществ в сырье листьев падуба парагвайского составляет $6,46 \pm 0,29\%$.

Определение содержания суммы флавоноидов

Установление наличия суммы флавоноидов в экстрактах в жидком состоянии осуществляли в спектрофотометрическим методом после того, как была проведена реакция получения комплекса с хлоридом алюминия в соответствии с методикой, приведенной в главе 2 «Материалы и методы».

Были сняты УФ-спектры поглощения рутина, кверцетина, спиртового (25% спирт) извлечения из сырья (рисунки 20 и 21). Были изучены спектры поглощения в видимой области комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия (рисунок 22).

Как видно на рисунке 22, полученный спектр близок к спектру поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия. Далее определяли содержание суммы

флавоноидов в пересчете на рутин.

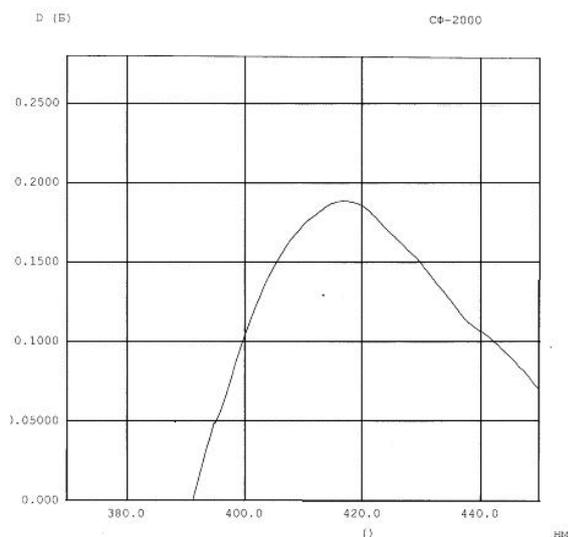


Рисунок 20 - Спектр поглощения рутина после добавления $AlCl_3$.

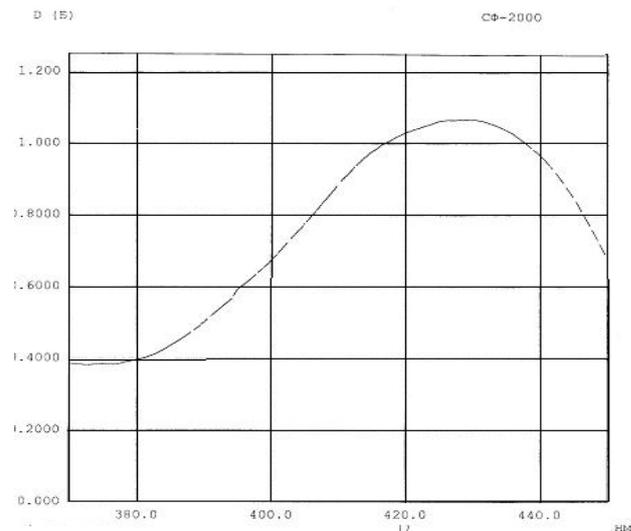


Рисунок 21 - Спектр поглощения кверцетина после добавления $AlCl_3$.

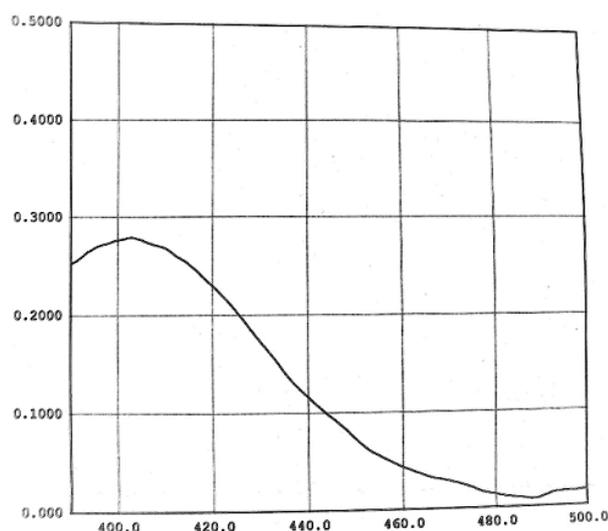


Рисунок 22 - Спектр поглощения спиртового извлечения листьев падуба парагвайского после добавления $AlCl_3$

Определение содержания суммы флавоноидов в жидких экстрактах проводили спектрофотометрически после реакции получения комплекса с хлоридом алюминия по методике, приведенной в главе 2 «Материалы и методы».

В результате исследований было выявлено, что содержание флавоноидов в листьях и черешках падуба парагвайского составляет - $1,89 \pm 0,05\%$.

Количественное определение кофеина

Содержание кофеина в водных и водно-спиртовых экстрактах различной

концентрации (15-70%) определяли по методике, приведенной в главе 2 «Материалы и методы».

Данные анализов приведены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты определения содержания кофеина (%), в зависимости от концентрации экстрагента, ($M \pm m$) в листьях и черешках падуба парагвайского

Экстрагент	Содержание кофеина, %
Вода очищенная ($t 27 \pm 2^\circ\text{C}$)	$1,791 \pm 0,012$
Этиловый спирт 15%	$1,809 \pm 0,016$
Этиловый спирт 20%	$1,821 \pm 0,011$
Этиловый спирт 25%	$1,868 \pm 0,012$
Этиловый спирт 30%	$1,836 \pm 0,010$
Этиловый спирт 40%	$1,712 \pm 0,016$
Этиловый спирт 50%	$1,683 \pm 0,013$
Этиловый спирт 60%	$1,636 \pm 0,015$
Этиловый спирт 70%	$1,572 \pm 0,019$

Можно понять, что экстракцию из листьев и черешков падуба парагвайского следует проводить при использовании раствора 25% этилового спирта в качестве экстрагента, так как выход кофеина ($1,868 \pm 0,012$) при этом максимален.

Определение золы общей и нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты

Эксперименты продемонстрировали, что показатель общей золы для сырья листьев падуба парагвайского не превышает 6%, а для нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%.

3.1.1 Нормирование качества листьев падуба парагвайского

Анализ результатов фармакогностического и фитохимического исследования представлен в таблице 16. Были приведены нормы качества листьев падуба парагвайского. Данные показатели представлены в сравнении с требованиями к фармакопейной статье Фармацевтического кодекса Германии, XI Французской фармакопее и VII Фармакопее Аргентины официальной НД на сырье, тем самым могут служить дополнением к существующей НД.

Таблица 16 - Числовые показатели листьев падуба парагвайского в сравнении с официальной НД ($M \pm m$)

Показатель	Фармакопейная статья <i>Geröstete mateblätter (M-065)</i>	Фармакопейная статья <i>MATE. Ilici paraguariensis folium</i>	Фармакопейная статья <i>YERBA MATE, hoja y tallo</i>	Сырье листьев падуба парагвайского
Внешние признаки	Сырье представляет собой предварительно обжаренные и высушенные листья. Цельные листья кожистые, обратнойцевидные, по краю – слабо вырезанные. Длина - от 6 до 12 см, ширина - от 5 до 6 см. Жилкование перистонервное, по краю с анастомозами. Верхняя поверхность листа темно-зеленая, нижняя светло-зеленая. Запах слабый, с ощущением «дыма», Вкус терпкий, вяжущий.	Фрагментированные листья падуба парагвайского, подвергнутые быстрой горячей сушке. Измельченные листья – кусочки неправильной полигональной формы, голые, размером от 2 до 4 мм, желто-зеленого цвета	Высушенные и измельченные листья и черешки падуба парагвайского	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	Лист в поперечном сечении. Бифациальная листовая пластинка; столбчатый мезофилл - двух- или трехслойный; губчатый мезофилл с большими межклеточными пространствами. Эпидермис покрыт прозрачной кутикулой, под некоторыми эпидермальными клетками заметны клетки со слизью. Сосудисто-волокнистый пучок центральной жилки - открытый, коллатеральный, с обкладкой из механических склерифицированных	Микропрепарат порошка характеризуется наличием фрагментов верхнего эпидермиса с прямостенными клетками и складчатой кутикулой, фрагменты эпидермиса с крупными устьицами (аномоцитный тип), в паренхиме	Верхний эпидермис листа с прямыми равномерно утолщенными стенками клеток, без устьичного аппарата. Нижний эпидермис со слегка гофрированными стенками, парацитным устьичным аппаратом и множеством гидатод. В нижнем и верхнем эпидермесе наблюдаются	Верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток с прямыми равномерно утолщенными клеточными стенками. Для эпидермиса верхней стороны листа характерна лучистая морщинистость кутикулы (устьица отсутствуют), друзы оксалата кальция, воздухоносные полости и кольчатые сосуды по жилке. Для эпидермиса нижней стороны листа характерна продольная морщинистость

Продолжение Таблицы 16

	волокон. Мезофилл с крупными друзами оксалата кальция. Лист с поверхности. Верхний эпидермис состоит из изодиаметричных клеток, с утолщенными стенками и складчатой кутикулой (устьица отсутствуют). Клетки нижнего эпидермиса - со слегка извилистыми стенками. Имеются многочисленные устьица (окружены 3-6 околоустьичными клетками) и гидатоды. С обеих сторон листа редко встречаются простые одноклеточные волоски. В мезофилле – отдельные кристаллы и друзы оксалата кальция	мезофилла – друзы оксалата кальция.	одноклеточные, простые волоски. В паренхимных клетках наблюдаются друзы с оксалатом кальция Устьичный индекс: 6.89 (10.13) 15.50	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	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	38,63±0,16
Дубильные вещества	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	6,46±0,29
Сумма флавоноидов	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	1,89±0,05
Содержание кофеина	Не менее 0,6%	Не менее 0,8%	Не менее 0,8%	1,868±0,012
Влажность	Отсутствует	Не более 8%	Не более 9,5%	4,25±0,13
Зола общая	Не более 8%	Не более 8%	Не более 9%	5,36±0,06
Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	0,39±0,08
Частицы сырья, утратившие окраску				

Продолжение Таблицы 16

(побуревшие, потемневшие, выцветшие)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	$0,5 \pm 0,03$
Другие частицы сырья, не соответствующие установленному описанию	Отсутствует	Отсутствует	Не более 1%	$0,7 \pm 0,03$
Органическая примесь	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	$0,02 \pm 0,001$
Минеральная примесь	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	$0,01 \pm 0,001$

Установлены параметры подлинности и характеристики качества сырья растительного происхождения листьев падуба парагвайского падуба в соответствии с отечественной ГФ. Это необходимо, чтобы осуществить стандартизацию и входной контроль. Также это необходимо, чтобы впоследствии совершенствовать технологию изготовления экстракта. Данные характеристики соответствуют требованиям Фармацевтического кодекса Германии, XI Французской фармакопее и VII Фармакопее Аргентины.

3.2 Выбор способа экстрагирования листьев падуба парагвайского

Для разработки ресурсосберегающей технологии экстракта листьев падуба парагвайского сухого необходимо было произвести теоретические расчеты эффективности экстрагирования, т.к. метод расчета противоточного экстрагирования связывает посредством математической зависимости результативность экстрагирования и соотношение внешней, внутренней концентрации экстрагируемых веществ и количеством уровней экстракции. Благодаря использованию этой методики, можно найти подходящие условия экстрагирования [128]. Требовалось установить соотношение фаз и количества диффузоров в батарее, чтобы осуществлять экстрагирование сырья.

Для того, чтобы установить величину соотношения фаз, применялась следующая методика [140, 129]: 50 г сырья (G), измельченного до 2-5 мм, помещали в воронку ($V=500 \text{ см}^3$, $\varnothing = 63 \pm 3,0$). Затем следовало уплотнение сырья до того, пока не перестанет меняться объем, уровень фиксировался специальной прижимной решеткой. Внутри помещался избыток экстрагента с фиксацией уровня жидкости. Затем сырье оставалось для набухания на сутки до того, пока не перестанет меняться уровень жидкости. После фиксации объема жидкости, осуществлялся слив экстрагента. После этого удалялась жидкость из диффузора, ее объем подлежал измерению, для величины соотношения фаз использовалась следующая формула:

$$y = E/G, \text{ где}$$

E – объем экстрагента, оставшийся в диффузоре после удаления

избыточного экстрагента;

G – масса загружаемого сырья.

Значение величины соотношения фаз в случае сырья листьев падуба парагвайского составляет $1,4 \text{ см}^3/\text{г}$ (величина образования внешнего сока).

После следовало определение количества стадий экстракции. В рамках проведения теоретических математических расчетов результативности процесса противоточного экстрагирования применялись технологические параметры, которым обладает сырье. Здесь следует упомянуть коэффициент поглощения сырья, формирования внутреннего сока, увеличения объема в процессе растворения экстрактивных веществ. Способы определения данных параметров приведены в главе 2 «Материалы и методы».

В таблице 17 можно увидеть общие результаты установления характеристик, которыми отличаются листья и черешки парагвайского падуба.

Таблица 17 – Характеристики, которыми обладают листья падуба парагвайского

Технологические показатели	Численные значения показателей
Коэффициент поглощения, $\text{см}^3/\text{г}$ по 25% спирту	1,89
Коэффициент образования внутреннего сока (К)	1,96
Коэффициент увеличения объема при растворении экстрактивных веществ	0,33

Для того, чтобы дать заблаговременную оценку максимально вероятной результативности процесса экстракции, применялась методика расчета, которая была создана для методики реперколяции с законченным циклом [106, 107]. Данная методика даст примерно оценить вероятную результативность экстрагирования листьев падуба парагвайского. Для того, чтобы определить подходящее количество диффузоров, требуется заранее установить постоянный коэффициент распределения веществ (η) в соответствии с формулой: $\eta = y/K = 1,4/1,96 = 0,71$. Метод проведения расчета соединяет между собой результативность экстрагирования (S) с сочетанием между внутренним и внешним соками и числом диффузоров, представленных в батарее. Установление эффективности экстрагирования противоточного типа (для η от 0,33 до 1,0) производили по выражению:

$$S = 54.43 - 2.496\eta + \frac{\eta \lg n}{0,007 - 0,0014\eta + 0.017\eta^2}, \text{ где}$$

η – коэффициент распределения веществ;

n – число диффузоров в батарее.

Принимая во внимание характеристики технологической категории, которые были определены в экспериментах, осуществляли определение теоретической результативности, которой обладает методика противоточной экстракции, осуществляемой в трех диффузорах. Соотношение при этом – 1:1,4 в соответствии с формулой:

$$S = 54.43 - 2.496 * 0,71 + \frac{0,71 * \lg 3}{0,007 - 0,0014 * 0,71 + 0.017 * 0,71^2} = 75,9\%$$

Нами было также спрогнозировано качество планируемого экстракта, одной из характеристик можно назвать концентрацию БАВ (С)

$$C = \frac{100 * x * S}{S(x + B) + \rho[104y - S(Z_x + B)]}, \text{ где}$$

y – сочетание фаз;

ρ – плотность экстрагента (г/см³);

S – результативность экстрагирования;

B – уровень влажности сырья;

x – количество экстрактивных веществ, присутствующих в сырье;

Z – коэффициент роста объема, который имеет место при растворении экстрактивных веществ.

Принимая во внимание параметры технологической категории, которые были получены в рамках экспериментов, осуществляли определение прогнозируемую концентрацию БАВ методом противоточной экстракции в 3-х диффузорах, с 25% спиртом этиловым в роли экстрагента при соотношении 1:1,4 по формуле:

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

Расчет в соответствии с этапами для батареи с количеством диффузоров от 3-х до 6-ти и соотношением фаз от 1,0 до 2,0 позволил установить соответствующие значения S (%) и C (%), которые можно увидеть в таблице 18.

Таблица 18 - Зависимость эффективности экстракции и концентрации БАВ в экстракте листьев падубы парагвайского

y	η	n=3		n=4		n=5		n=6	
		S (%)	C (%)	S (%)	C (%)	S (%)	C (%)	S (%)	C (%)
1,0	0,51	75,9±0,002	95,8±0,001	81,8±0,002	96,1±0,001	86,4±0,002	96,3±0,001	90,2±0,002	96,5±0,002
1,1	0,56	76,2±0,001	95,8±0,001	82,2±0,002	96,1±0,002	86,9±0,002	96,4±0,001	90,8±0,001	96,5±0,001
1,2	0,61	76,2±0,001	95,8±0,001	82,3±0,001	96,2±0,003	87,1±0,001	96,4±0,002	90,9±0,003	96,5±0,003
1,3	0,66	76,2±0,001	95,8±0,002	82,2±0,002	96,1±0,002	87,0±0,001	96,4±0,001	90,9±0,001	96,5±0,001
1,4	0,71	75,9±0,002	95,8±0,003	82,0±0,002	96,1±0,002	86,7±0,001	96,4±0,002	90,5±0,001	96,5±0,001
1,5	0,76	75,5±0,001	95,8±0,003	81,6±0,003	96,1±0,002	86,2±0,003	96,3±0,003	90,0±0,002	96,5±0,001
1,6	0,81	75,1±0,002	95,7±0,002	81,0±0,001	96,1±0,001	85,7±0,002	96,3±0,001	89,4±0,002	96,5±0,002
1,7	0,86	74,6±0,003	95,7±0,001	80,5±0,001	96,0±0,002	85,0±0,001	96,3±0,002	88,7±0,003	96,4±0,001
1,8	0,92	74,0±0,001	95,7±0,002	79,7±0,002	96,0±0,001	84,1±0,002	96,2±0,001	87,7±0,002	96,4±0,002
1,9	0,97	73,4±0,003	95,7±0,003	79,0±0,003	96,0±0,002	83,3±0,001	96,2±0,001	86,9±0,001	96,3±0,002
2,0	1,02	72,8±0,002	95,6±0,001	78,3±0,002	95,9±0,003	82,5±0,001	96,2±0,001	86,0±0,002	96,3±0,001

Исследование таблицы 18 демонстрирует, что, когда осуществляется рост количества диффузоров с 3-х до 4-х, результативность экстракции увеличивается на $6,1 \pm 0,09\%$ и составляет $82,0 \pm 0,002\%$. После $n=4$ увеличение результативности теряет свою интенсивность. Прогнозируемая концентрация БАВ практически не изменяется при увеличении числа диффузоров (содержание БАВ увеличивается на $<1\%$). Также, теоретический расчет эффективности выявил, что на прогнозируемую концентрацию БАВ практически не влияет увеличение соотношения фаз (содержание БАВ увеличивается на $<1\%$).

Если $n=4$, $y=1,2$ то при использовании сырья, в котором наличие экстрактивных веществ составляет $38,63 \pm 0,16\%$, может быть изготовлен экстракт, в котором прогнозируемое содержание БАВ - $96,2 \pm 0,003\%$. Рост соотношения фаз или числа диффузоров, не приводит к существенным увеличениям эффективности, но значительно усложняет процесс экстракции и делает его дорогим.

Учитывая полученные результаты собственных экспериментов, а также анализ данных, приведенных в таблице 18, целесообразно остановиться на батарее из четырех диффузоров и соотношении фаз - $1,2 \text{ см}^3/\text{г}$.

3.3 Технология получения экстракта листьев падуба парагвайского сухого

С целью получения препарата, удобного при хранении и транспортировке, а также более устойчивого с микробиологической точки зрения, была разработана технология сухого экстракта падуба парагвайского- *extracti Ilis paraguayensis sicci*. На базе кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) проведено масштабирование технологии производства сухого экстракта падуба парагвайского путем замены оборудования лабораторного типа на полупромышленный тип. Список оборудования представлен в главе 2 «Материалы и методы». Для экстракции использовали сырье, $10,0 \text{ кг}$ измельченных листьев падуба парагвайского и экстрагент - $25\% \text{ p-p}$ этилового спирта (рисунок 23).

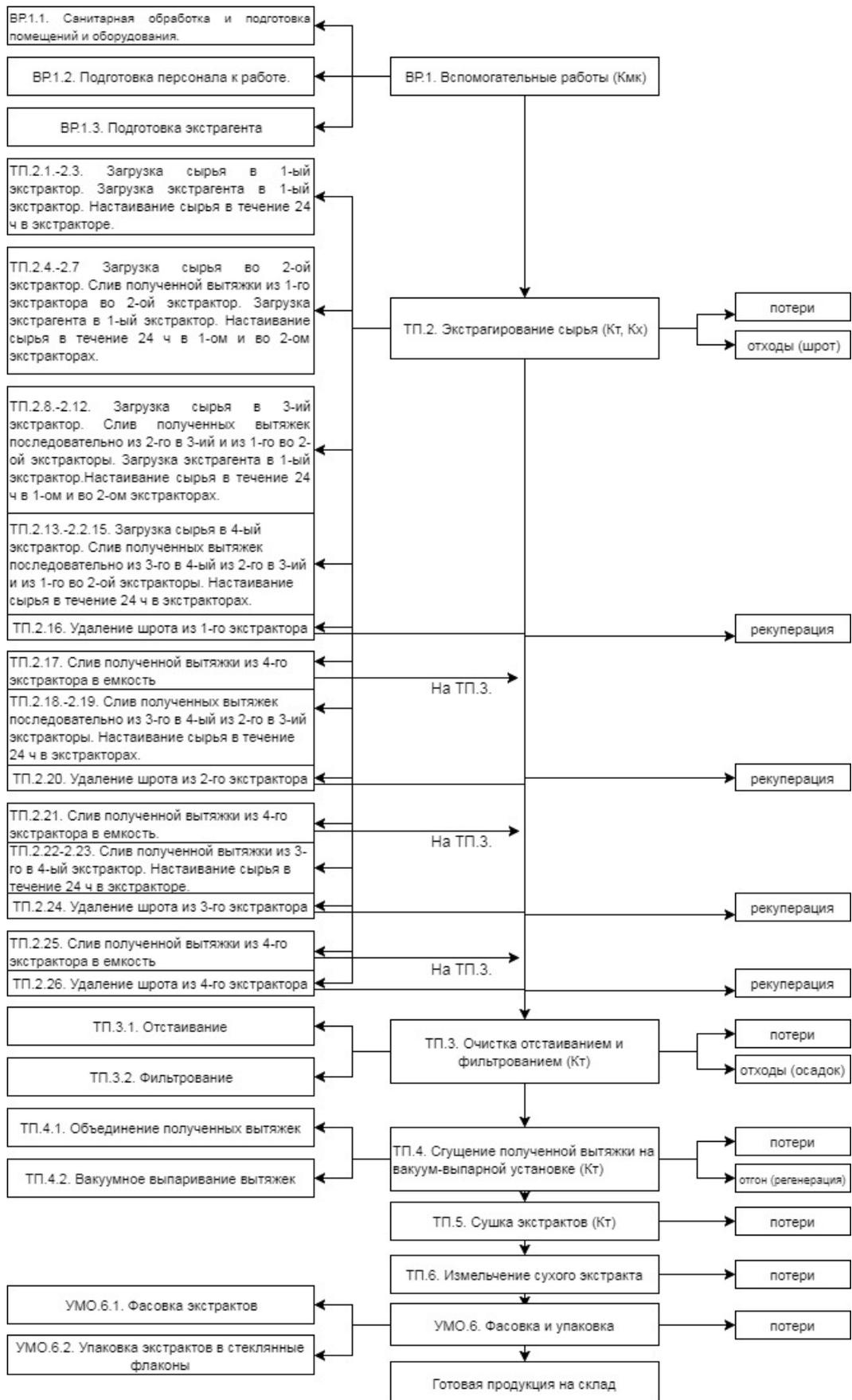


Рисунок 23 – Схема получения экстракта падуба парагвайского сухого методом противоточной экстракции

В соответствии со схемой, которую можно увидеть на рисунке 23, технологический процесс изготовления экстракта листьев падубы парагвайского сухого складывался из следующих стадий.

ВР.1. Вспомогательные работы.

ВР.1.1. Санитарная обработка и подготовка помещений и оборудования.

Производство сухих экстрактов с использованием сырья растительного происхождения следует проводить особым образом в оборудованном для этого помещении. Помещение относится к категории D. Следует оборудовать его вентиляцией принудительного или приточно-вытяжного типа. Перед тем, как приступить к работе, помещение подвергалось влажной уборке. Для этого рабочие столы и полы обрабатывали с использованием моющих средств. Были осмотрены внутренние поверхности экстракторов. Если это требовалось, их обрабатывали при помощи специального моющего средства P3-Cosa® (EcoLab GmbH, Германия), которое разводилось в воде питьевой, после этого последовательно смывали водой питьевой и очищенной.

Проводили наладку насосов.

Была проверена исправность соединительных проводов, розеток и заземления.

ВР.1.2. Подготовка персонала к работе.

Перед тем, как начать работу, персоналу следовало сменить одежду. Для этого использовался костюм для общей защиты, специальную обувь, возможно было применение бахил поверх обуви. На волосы помещался головной убор. Руки мылись мылом туалетным.

ВР.1.3. Подготовка экстрагента.

Перед началом экстракции необходимо подготовить необходимое количество экстрагента – 25% водного раствора этилового спирта. Для этого расчетное количество 96% спирта этилового из мерника загружали в смеситель и затем добавляли очищенную воду до рассчитанного объема раствора, в результате разности плотностей происходило самопроизвольное перемешивание.

ТП.2. Экстрагирование сырья.

Экстрагирование сырья осуществляли методом противоточной экстракции с делением сырья на неравные части при температуре 75°C [186]. 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.).

ТП.2.1.-2.16. Получение жидкого экстракта.

Сырье поступало в установку, в которой присутствовали четыре экстрактора. Первая часть сырья, вес которой составил четыре килограмма, помещалась в экстрактор №4, после чего туда добавляли экстрагент до «зеркала». Смесь должна была настаиваться на протяжении суток.

На следующий день вторую часть сырья, масса которого составляет три килограмма, помещали в экстрактор №3, смешивали с вытяжкой, извлеченной из экстрактора №4. В последний наливали вторую порцию экстрагента, вновь до «зеркала». Настаивание происходило на протяжении суток в обоих экстракторах.

На следующий день третью долю сырья массой в два килограмма располагали в экстракторе №2, смешивали с вытяжкой из экстрактора №3. В последний помещали вытяжку, полученную из экстрактора №4. В экстрактор же №4 наливался оставшийся экстрагент. Настаивание продолжалось на протяжении суток.

На следующий день четвертую долю сырья весом в один килограмм располагали в экстракторе №1 и добавляли вытяжку из экстрактора №2. В последний заливали вытяжку, полученную из экстрактора №3, в экстрактор №3 – вытяжку из экстрактора №4. Последний подлежал отключению. Далее настаиванию подлежало содержимое экстракторов №1, 2, 3, также на протяжении суток.

На пятые сутки вытяжку, которая присутствовала в экстракторе №1, сливали в емкость, направляли в сборник. В экстрактор №1 помещали вытяжку из экстрактора №2, в последний заливали вытяжку из экстрактора №3. Этот

экстрактор подлежал отключению. Настаивание продолжалось в экстракторах №1 и 2 на протяжении суток.

На шестой день сливанию подлежала вытяжка из экстрактора №1 в отдельную емкость, после чего она направлялась в сборник. В экстрактор №1 помещали вытяжку из экстрактора №2. Экстрактор №2 подлежал отключению. Сырье продолжало настаиваться на протяжении суток в экстракторе №1.

На седьмые сутки вытяжка удалялась из экстрактора №1, после чего она направлялась в сборник, а экстрактор отключался.

ТП.3. Очистка отстаиванием и фильтрованием.

Извлечения очищались посредством отстаивания на протяжении сорока восьми часов, температура устанавливалась $7\pm 1^\circ\text{C}$. Это делалось до того, как надсадочная жидкость не становилась прозрачной. После этого ее подвергали фильтрации сквозь фильтр из бумаги.

ТП.4. Сгущение полученной вытяжки на вакуум-выпарной установке.

Полученную субстанцию, которая вытягивалась из листьев парагвайского падуба со стадии ТП.3, подвергали упариванию на вакуум-выпарной установке (Heidolph laborota 4000, Германия) с вакуумным насосом V-700 (BUCHI, Германия), устанавливается температура 60°C и давления 72 мБар. Процедура продолжается на протяжении восьми часов до того, как объем уменьшится вдвое.

ТП.5. Сушка экстракта

Сушка осуществлялась при помощи сушильного аппарата сублимационного типа (Heto Drywinner, Дания). Сгущенное извлечение разливали по одноразовым контейнерам для замораживания Celsius-Pak (Sartorius Stedim Biotech, Германия), замораживали при -24°C в морозильном устройстве. Время обработки – восемь часов. После этого в камеру сушильного устройства помещали содержимое предыдущей обработки. Сушильное устройство оснащено вакуумно-роторным насосом RZ 2 (Vacuumbrand, Германия) на 24 часа, где создавали глубокий вакуум (0,01 мБар) [137].

ТП.6. Измельчение сухого экстракта

Полученный сублимационно-высушенный экстракт измельчали на

универсальной мельнице М-20 (ИКА, Германия) и просеивали через сито 1,0 мм. Измельченный сухой экстракт передавался на упаковку.

УМО.6. Фасовка и упаковка

УМО.6.1 Фасовка экстрактов

Полученный в результате сушки порошок фасовали по 100 г.

УМО.6.2. Упаковка экстрактов в стеклянные флаконы

Расфасованные экстракты упаковывали в стеклянные флаконы объёмом 250 мл.

Технологический контроль производства осуществлялся на следующих точках (таблица 19):

Таблица 19 – Технологический контроль производства экстракта падубы парагвайского сухого

Наименование стадий	Объект контроля	Контролируемый параметр	Регламентированный параметр	Методы и средства контроля
ВР.1.3. Подготовка экстрагента	Этиловый спирт	Концентрация	Не менее 95%	По специальной методике (Алкоголиметрия)
ТП.2. Экстрагирование сырья	Жидкий экстракт	Время настаивания	Не менее 24 часов для каждой операции	-//-
ТП.3. Очистка отстаиванием и фильтрованием	Жидкий экстракт	Твердые частицы	Отсутствие	Визуально
ТП.4. Сгущение полученной вытяжки на вакуум-выпарной установке	Густой экстракт	Влажность	Не более 25%	По специальной методике
ТП.5. Сушка экстракта	Сухой экстракт	Влажность	Не более 5%	По специальной методике
ТП.6. Измельчение сухого экстракта	Сухой экстракт	Размер частиц	0.07-0.79 мм	По ГФ XIV
УМО.6. Фасовка и упаковка	Сухой экстракт	Физический анализ	Отклонение в массе не более 5%	По ГФ XIV
Готовый продукт	Сухой экстракт во флаконах	Проверка числовых показателей	-//-	-//-

Также, для отслеживания качества получаемого экстракта листьев падуба парагвайского на каждой ключевой стадии технологического процесса было исследовано содержание экстрактивных веществ и кофеина (таблица 20).

Таблица 20 – Результаты, полученные в рамках исследования наличия экстрактивных веществ и кофеина в полупродуктах на стадиях технологического процесса ($M \pm m$)

Стадия процесса	Содержание экстрактивных веществ, $M \pm m$, %	Содержание кофеина, $M \pm m$, %
Экстрагирование сырья	$37,98 \pm 0,07$	$2,054 \pm 0,05$
Очистка отстаиванием и фильтрованием	$38,55 \pm 0,09$	$2,047 \pm 0,06$
Сгущение полученной вытяжки	$72,84 \pm 0,04$	$2,045 \pm 0,05$
Сушка экстракта	$98,54 \pm 0,02$	$2,021 \pm 0,06$

Анализ таблицы 20 показал, что при использовании технологии противоточного экстрагирования с делением сырья на неравные части листьев падуба парагвайского, на ключевых стадиях не происходит изменений содержания основного действующего вещества в количественном выражении сырья – кофеина ($2,021 \pm 0,06\%$).

С целью дальнейшего использования экстракта падуба парагвайского сухого в качестве активного вещества для производства ЛФ, были изучены его технологические характеристики.

3.3.1 Показатели качества экстракта листьев падуба парагвайского сухого

Описание

Спиртовой экстракт из измельченных сухих листьев падуба парагвайского представляет собой сухой, мелкодисперсный, сыпучий порошок коричневато-бежевого цвета с зеленым оттенком, с характерным терпким запахом и своеобразным вкусом (рисунок 24).



Рисунок 24 - Спиртовой экстракт из измельченных сухих листьев падуба парагвайского

Микроскопическое исследование экстракта сухого

В составе сухих экстрактов присутствуют элементы, которые обладают формой и размером, служащими причиной наличия ряда технологических характеристик. В качестве примера последних можно привести уровень сыпучести, насыпного объема и ряда других. Для микроскопического исследования применялись микроскопы Hirox Nuerique KH-7700 и Celestron Deluxe с LCD при 200× и 400× кратном увеличении (рисунок 25 и 26).

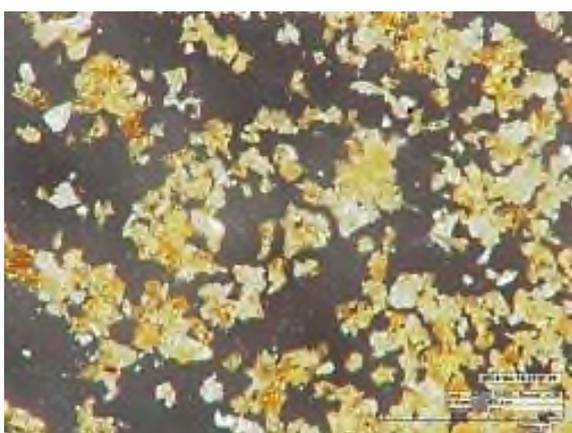


Рисунок 25 - Микроскопическая картина экстракта падуба парагвайского сухого при 200× увеличении



Рисунок 26 - Микроскопическая картина экстракта падуба парагвайского сухого при 400× увеличении

При 200× увеличении видны агрегаты из частиц с различными размерами.

Поверхность частиц шероховатая, блестящая. При 400× увеличении наблюдались колоннообразные с гладкой поверхностью, в некоторых местах слипшиеся частицы. Результаты микроскопического исследования экстракта падуба парагвайского сухого выявили, что форма, размер, поверхность и степень агломерации частиц могут существенно затруднять текучесть экстракта при производстве.

Количественное содержание основных действующих веществ

По данным литературы, описанным в главе 1, основными действующими веществами падуба парагвайского являются пуриновые алкалоиды (кофеин, теобромин, теофиллин). В связи с этим, стандартизацию сухого экстракта, проводили именно по этим БАВ. Количественное содержание основных БАВ определяли посредством методики ВЭЖХ, который был приведен во второй главе. В таблице 21 представлены результаты количественного определения основных действующих веществ в экстракте падуба парагвайского сухом.

Таблица 21 - Содержание кофеина, теобромина, теофиллина (%) в экстракте падуба парагвайского сухом в количественном выражении ($M \pm m$)

Действующие вещества	Количественное содержание, %
Кофеин	2,015±0,009
Теобромин	0,181±0,012
Теофиллин	0,017±0,002

В ходе исследования было выявлено, что количественное содержание кофеина составило 2,015±0,009%, теобромина 0,181±0,012%, теофиллина 0,017±0,002%.

Изучение технологических характеристик полученного экстракта

Сухой экстракт оценивали в соответствии с такими характеристиками: описание, потеря в массе при высушивании, уровень сыпучести, угол естественного откоса, насыпной объем, тяжелые металлы, масса содержимого упаковки, в соответствии с методиками описанными в главе 2.

Степень сыпучести сухого экстракта устанавливали посредством устройства SVM 121 Erweka, Германия, где V10, V500, V2500 количество соскоков цилиндра. Определение параметра угла естественного откоса, а также уровень сыпучести, который имеется у экстракта сухого, подлежали определению посредством

устройства Erweka GTB, Германия. Количество влаги в сухом экстракте устанавливалось посредством устройства для исследования уровня влажности OHAUS MB-35.

Результаты исследования технологических параметров экстракта падуба парагвайского сухого, полученного методом противоточной экстракции с делением сырья на не равные части представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Показатели и нормы качества экстракта падуба парагвайского сухого

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

Экстракт падуба парагвайского сухой, полученный методом противоточной экстракции с делением сырья на неравные части, представлял собой сухой мелкодисперсный порошок коричневато-бежевого цвета, иногда с зеленым оттенком, с характерным терпким запахом и своеобразным вкусом.

Определить уровень сыпучести в соответствии со скоростью истечения из воронки не получилось по причине того, что экстракт застрял в воронке тестера.

Т.к. сыпучесть экстракта отсутствовала, то угол естественного откоса был определен при постукивании по корпусу воронки диаметром 10 мм. Угол естественного откоса составил - $37,5 \pm 1,8^\circ$. Исследования показателей «Насыпной объем» и «Насыпная плотность» установили, что экстракт падуба парагвайского сухой обладает плохой текучестью (индекс Carr = 41 %, индекс Hausner = 1,69).

По результатам исследования физико-химических и технологических параметров экстракта листьев парагвайского падуба сухого было установлено, что у экстракта не наблюдается подходящих технологических параметров. О том, что требуется применять эффективные ВВ, которые приведут к улучшению технологических параметров экстракта, говорят угол естественного откоса, низкая сыпучести и текучесть. Также требуется добавить в технологическую схему стадии гранулирования.

Проведен фармакогностический и фитохимический анализ листьев падуба парагвайского в соответствии с требованиями фармакопейной статьи YERBA MATE, hoja y tallo VII Фармакопеи Аргентины [177], а также фармакопейной статьи Geröstete mateblätter (M-065) Фармацевтического кодекса Германии [167, 168] и фармакопейной статьи MATÉ. Placi paraguariensis folium XI Французской фармакопеи [212].

Создана технология изготовления экстракта сырья падуба парагвайского сухого, на основе которой был разработан лабораторный регламент. Полученные результаты фармакогностического и фитохимического анализа, сравнивались с требованиями фармакопейных статей VII Фармакопеи Аргентины, Фармацевтического кодекса Германии и XI Французской фармакопеи.

Выводы к главе 3

1. Определены макро- и микроскопические характеристики, числовые показатели. Также осуществлено фитохимическое исследование сырья. С помощью качественных реакций и ТСХ подтверждено наличие в исходном сырье основных БАВ алкалоидной природы (кофеин, теобромин, теофиллин).

2. Разработан регламент для технологии изготовления методом противоточной экстракции с делением сырья на неравные части и блок-схема производства экстракта падуба парагвайского сухого в лабораторных условиях (Приложение К);

3. Определено количественное содержание пуриновых алкалоидов в экстракте падуба парагвайского сухом: кофеин - $2,015 \pm 0,009\%$, теобромин - $0,181 \pm 0,012\%$, теофиллин - $0,017 \pm 0,002\%$.

4. Проведенные эксперименты, направленные на исследование технологических характеристик сухого экстракта, дают возможность сделать заключение о том, что он не обладает удовлетворительными технологическими характеристиками. Об этом свидетельствует угол естественного откоса, отсутствие сыпучести экстракта. Это обуславливает необходимость использования эффективных ВВ, а также необходимость введения в процесс стадии гранулирования.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛФ СКЭП

4.1 Разработка состава и технологии получения ЛФ СКЭП

Перечень возможных к использованию действующих веществ приведен в 1 главе «Обзор литературы», там же дано обоснование их использования, как по химическому составу, так и фармакологическому действию. Следует также отметить, что принималось во внимание доступность сырья для разработки рецептуры и технологии, а также удобство применения. В качестве лекарственной формы препарата рассматривалась возможность использования такой формы, как твердые желатиновые капсулы.

Алгоритм исследования включал:

1. Изучение технологических характеристик выбранных действующих веществ (экстракты падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислоты);
2. Подбор технологических параметров гранулирования (состав и количество ВВ, выбор гранулирующего агента, скорость оборотов мешалки и чопера, время гранулирования);
3. Анализ полученных гранулятов;
4. Создание лекарственной формы;
5. Анализ качества полученной лекарственной формы.

4.1.1 Изучение технологических характеристик действующих веществ

Сухие экстракты демонстрируют определенные технологические и физико-химические характеристики. Последние в большей мере влияют на производство препаратов в твердом состоянии. Также они оказывают влияние на выбор определенной технологии, качество получаемой продукции.

Результаты анализа технологических характеристик, которыми обладает экстракт падуба парагвайского сухого, полученный методом противоточной экстракции, представлены в главе 3 «Получение экстракта падуба парагвайского сухого».

Для исследования нами был выбран стандартизированный экстракт элеутерококка колючего сухой производства ООО «Хармс», Россия, партия № 010215, годен до 03.2018.

Экстракт элеутерококка колючего сухой – это аморфный порошок. Его цвет варьируется от желтого до светло-коричневого. Запах специфический. Порошок отличается гигроскопичностью, комкуется (рисунок 27).



Рисунок 27 - Экстракт элеутерококка колючего сухой

Микроскопическое исследование было проведено с использованием микроскопов Hiox Nuerique KH-7700 и Celestron Deluxe с LCD при 200× и 400× кратном увеличении (рисунок 28 и 29).

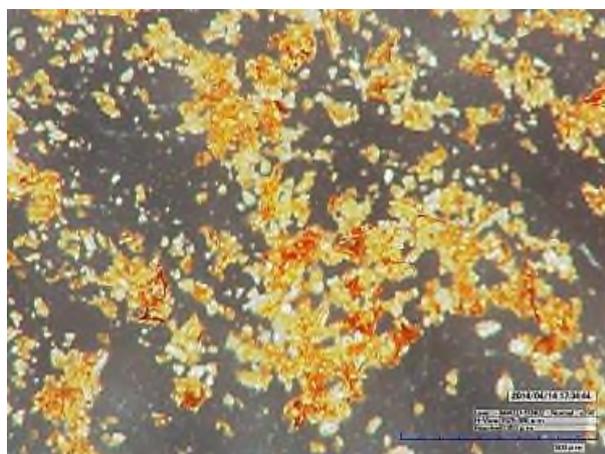


Рисунок 28 - Микроскопическая картина экстракта элеутерококка колючего сухого при 200× увеличении

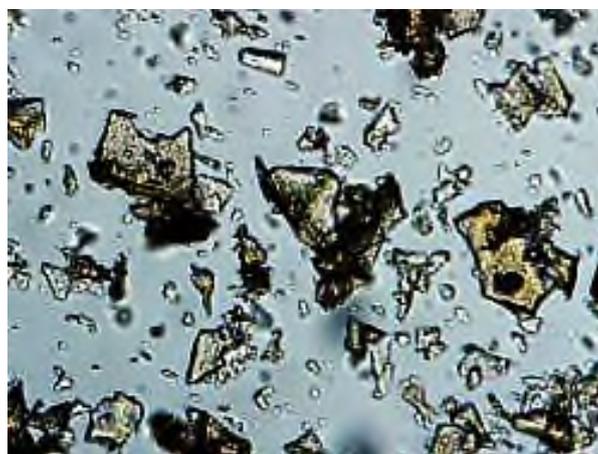


Рисунок 29 - Микроскопическая картина экстракта элеутерококка колючего сухого при 400× увеличении

При 200× увеличении видны агрегаты из частиц с различными размерами. Поверхность частиц гладкая, блестящая (рисунок 28). При 400× увеличении наблюдались колоннообразные с гладкой поверхностью, в некоторых местах слипшиеся частицы (рисунок 29). Результаты микроскопического исследования экстракта элеутерококка колючего сухого выявили, что форма, размер, поверхность и степень агломерации частиц могут существенно затруднять текучесть экстракта.

Экстракт элеутерококка сухой оценивали в соответствии со следующими технологическими параметрами: потеря в массе при высушивании, уровень сыпучести, угол естественного откоса, насыпной объем, тяжелые металлы, масса содержимого упаковки, по методам, которые приведены во второй главе.

Для определения уровня сыпучести экстракта элеутерококка колючего сухого использовалось устройство SVM 121 Erweka, Германия, где V_{10} , V_{500} , V_{2500} является числом соскоков цилиндра. Устройство Erweka GTB, Германия, применялось для установления угла естественного откоса, а также уровня сыпучести экстракта сухого. Наличие влаги в экстракте сухом устанавливалось при помощи устройства, предназначенного для определения уровня влажности ОНАУС МВ-35.

Результаты исследования технологических параметров экстракта элеутерококка колючего сухого представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Технологические характеристики экстракта элеутерококка колючего сухого

Показатель	Результат определения
Внешний вид	Аморфный порошок, цвет от желтого до светло-коричневого, отличается особым запахом. Обладает гигроскопичностью, комкуется.
Влажность, %	3,91±0,05
Насыпной объем:	
насыпной объем до уплотнения (V_0), мл	170±1,7
насыпной объем после уплотнения (V_{2500}), мл	92±1,9
Способность порошка к уплотнению ($V_{10} - V_{500}$), мл:	18±1,5
Насыпная плотность:	
насыпная плотность до уплотнения (m/V_0), г/мл	0,36±0,1

Продолжение Таблицы 23

насыпная плотность после уплотнения (m/V_{2500}), г/мл	0,68±0,2
Сыпучесть (d=10, 15, 25 мм), г/с	Отсутствует
Угол естественного откоса (при d=10 мм), °	35,5±1
Carr Index, %	47
Hausner Ratio	1,88
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями ОФС.1.2.2.2.0012.15
Остаточные органические растворители	В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0008.15

Экстракт элеутерококка колючего сухой приобретенный у ООО «Хармс» представлял собой сухой мелкодисперсный, гигроскопичный порошок от желтого, серовато-желтого до светло-коричневого цвета, сыпучесть отсутствовала, Т.к. сыпучесть экстракта отсутствовала, то угол естественного откоса был определен при постукивании по корпусу воронки диаметром 10 мм. Угол естественного откоса он имел значение - 35,5±1°.

Далее нами была исследована стандартизированная субстанция-порошок янтарной кислоты производства ОАО «Марбиофарм», Россия, партия № 150914, годен до 10.2018.

Субстанция-порошок представляла собой кристаллообразный порошок белого цвета с ярко-выраженным лимонным вкусом.

При проведении микроскопического исследования (при 400× увеличении) были обнаружены шероховатые, колоннообразные кристаллы различной формы (рисунок 30). Результаты микроскопического исследования янтарной кислоты выявили, что форма, размер, и поверхность частиц существенно затрудняют текучесть субстанции-порошка янтарной кислоты.

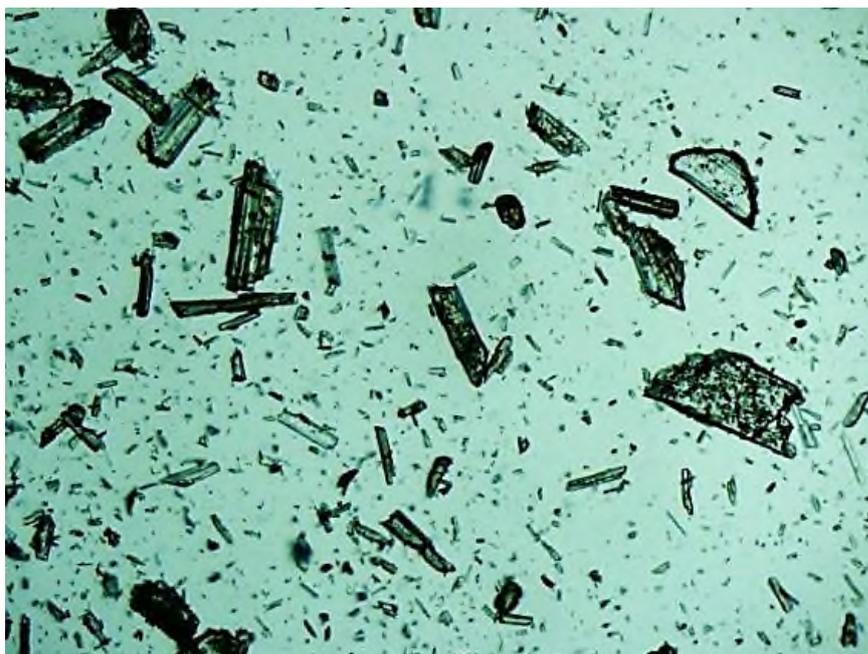


Рисунок 30 - Микроскопическая картина субстанции-порошка янтарной кислоты при 400× увеличении

Результаты, полученные в рамках исследования технологических характеристик, которые имеются у субстанции, можно увидеть в таблице 24.

Таблица 24 - Технологические характеристики субстанции-порошок янтарной кислоты

Показатель	Результат определения
Внешний вид	Белый кристаллообразный порошок с ярко-выраженным лимонным вкусом.
Влажность, %	4,52±0,04
Насыпной объем:	
насыпной объем до уплотнения (V_0), мл	150±0,9
насыпной объем после уплотнения (V_{2500}), мл	86±1,3
Способность порошка к уплотнению ($V_{10} - V_{500}$), мл:	14±1,1
Насыпная плотность:	
насыпная плотность до уплотнения (m/V_0), г/мл	0,49±0,1
насыпная плотность после уплотнения (m/V_{2500}), г/мл	0,61±0,2
Сыпучесть (d=10, 15, 25 мм), г/с	Отсутствует, 1,76±0,15, 2,07±0,11
Угол естественного откоса (при d=15 мм) °	39±1,5
Carr Index, %	19,7
Hausner Ratio	1,24
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями ОФС.1.2.2.2.0012.15
Остаточные органические растворители	В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0008.15

Субстанция-порошок янтарной кислоты приобретенная у ОАО «Марбиофарм» представляла собой сухой мелкодисперсный, гигроскопичный, кристаллический порошок белого цвета, сыпучесть при диаметре воронки 10 мм - отсутствовала, при диаметре воронки 15 мм составляла $1,76 \pm 0,15$, а при 25 мм - $2,07 \pm 0,11$, угол естественного откоса имел низкое значение при диаметре воронки 15 мм - $39 \pm 1,5^\circ$.

Из приведенных данных на рисунках 28-30 и в таблицах 23 и 24, следует вывод, что экстракт элеутерококка сухой и субстанция-порошок янтарной кислоты не способны перейти на стадию капсулирования без дополнительной стадии гранулирования, а также дополнительного введения ВВ улучшающих технологические характеристики изучаемых АВ.

4.1.2 Определение смачиваемости сухих экстрактов

Процесс смачивания играет существенную роль в основных способах гранулирования различных веществ, в том числе сухих экстрактов, поэтому изучение его приобретает большое значение для оптимизации процессов гранулирования [9, 130].

Смачиваемость навески препарата массой 10 г определяли при температурах 20, 30, 40, 50, 60 и 70°C, фиксируя время полного намокания частиц (в секундах).

Данные экспериментов представлены в таблице 25.

Таблица 25 - Исследование смачиваемости экстракта элеутерококка сухого и экстракта падуба парагвайского сухого

Температура воды, С	Время смачивания, сек	
	Экстракт элеутерококка сухой	Экстракт падуба парагвайского сухой
20	$2110 \pm 0,6$	$19 \pm 0,5$
30	$1543 \pm 0,8$	$16 \pm 0,4$
40	$905 \pm 0,4$	$4 \pm 0,4$
50	$728 \pm 0,9$	$1 \pm 0,3$
60	$459 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,1$
70	$385 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,1$

Из приведенных выше данных был сделан вывод, что скорость смачивания экстракта элеутерококка колючего сухого значительно отличалась от скорости смачивания экстракта падуба парагвайского сухого. Наибольшая скорость

смачивания экстракта элеутерококка колючего сухого достигается при температуре 70°C, а максимальная скорость смачивания экстракта падуба парагвайского сухого достигается при температуре 50°C.

В соответствии с результатами исследования можно увидеть, что при технологии гранулирования необходим рациональный подбор ВВ (дополнительное введение влагораспределяющего вещества).

4.1.3 Выбор вспомогательных веществ

В рамках создания лекарственных форм, в которые включаются гигроскопичные растительные экстракты, очень важным является правильно выбрать ВВ. Для гранулирования у ВВ должна быть невысокая гигроскопичность. Помимо этого, от них требуется устойчивость в рамках хранения, небольшое время растворения гранул и высокий уровень распадаемости в ЖКТ [52, 79].

После того, как были исследованы научные, патентные, научно-технические литературные источники, для гранулирования были отобраны такие ВВ: PROSOLV SMCC®90 LM (JRS PHARMA GmbH&Co. KG, Германия), Vivasol®GF (JRS PHARMA GmbH&Co. KG, Германия), Vivastar® (JRSPHARMA GmbH&Co. KG, Германия), AEROPERL® 300 Pharma (Evonik Industries, Германия), Vivapur® 101 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия), Vivapur® 103 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия), LYCATAB® C (Roquette, Франция), LYCATAB® PGS (Roquette, Франция), KLEPTOSE® standard (Roquette, Франция), Kollidon® (BASF, Германия), спирт этиловый (ООО «СпиртТорг», Россия), лактоза (Panreac, Испания). Характеристики ВВ представлены в таблице 26 [23].

Таблица 26 - Характеристики ВВ для гранулирования

Наименование ВВ	Стандарт качества	Состав, формула	Характеристика ВВ
VIVAPUR® 101	Ph.Eur., NF, JP	Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	Стандартная марка микрокристаллической целлюлозы, хорошо подходит для влажной грануляции. Насыпная плотность 0,26-0,31 г/мл. Средний размер 65 мкм.
VIVAPUR® 103	Ph.Eur., NF, JP	Микрокристаллическая целлюлоза	Тип МКЦ того же качества, что и 101, но с очень низкой влажностью (<1,5%) для производства препаратов с активными ингредиентами, чувствительными к влаге. Насыпная плотность 0,26-0,34 г/мл. Средний размер 65 мкм.
Vivasol® GF	Ph.Eur., NF, JP	Кроскармеллоза натрия	Используется в качестве дезинтегранта для оральных лекарственных форм. Потеря в массе при высушивании 10%.
PROSOLVSMCC®90 LM	Ph.Eur., NF, JP	Микрокристаллическая целлюлоза (98%), коллоидный диоксид кремния (2%)	Силифицированная микрокристаллическая целлюлоза. Используется как носитель для экстрактов ЛРС. Насыпная плотность 0,37 г/см ³ . Средний размер частиц 110 мкм.
Vivastar® P	Ph.Eur., NF, JP	Натрия крахмал гликолят	Белый, сыпучий, сильно гигроскопичный порошок. Используется в качестве дезинтегранта, для прямого прессования или во влажной грануляции.
AEROPERL® 300 Pharma	USP/NF, Ph.Eur.	Кремния диоксид коллоидный гранулированный	Гранулированный коллоидный диоксид кремния; средний размер частиц 30 мкм, удельная поверхность 300 м ² /г, насыпная плотность около 280 г/л,. Обеспечивает хорошую текучесть в свободном и в связанном с жидкостью состоянии; превращает жидкие и пастообразные вещества в сыпучие порошки; адсорбент, осушитель.
LYCATAB® C	USP/NF, Ph.Eur.	Крахмал кукурузный частично прежелатинизированный	Применяется для того, чтобы осуществлять гранулирование воды с применением оборудования, которое имеет значительное усилие сдвига. Это разрыхляющее вещество. Крахмал не в полной мере растворяется в охлажденной воде. Способствует твердости, а также приводит к совершенствованию распада таблеток. Насыпная плотность 0,64 г/см ³ . Средний размер частиц 100 мкм.
LYCATAB® PGS	USP/NF, Ph.Eur.	Крахмал кукурузный полностью прежелатинизированный	Белый или бледно-кремовый порошок с индифферентным вкусом, обладает хорошими свойствами текучести и связывающими свойствами; полностью растворяется в воде. Средний размер частиц 80-315 мкм.

Продолжение Таблицы 26

KLEPTOSE®	USP/NF, Ph.Eur., JP	β-циклодекстрин	Белый, кристаллический порошок, практически без запаха. β-циклодекстрин содержит 7 остатков глюкозы. Добавление β-циклодекстринов может улучшать стабильность, а также цулучшать растворимость плохо растворимых соединений.
Лактоза	USP/NF, Ph.Eur.	Лактоза	Белый кристаллический порошок, не имеет запаха. Наполнитель и связующий элемент ВВ. Используются для процесса гранулирования или для того, чтобы усовершенствовать характеристики порошков фармацевтического назначения. Использование ВВ может приводить к снижению уровня формирования пыли, а также расслоения порошка. Также оно совершенствует сыпучесть, прессуемость смеси ВВ и АВ.
Kollidon®	USP/NF, Ph.Eur., JP	Поливинилпирролидон (ПВП)	Желто-белый или белый порошок. Имеет свойства связующего элемента. Для производства таблетированных препаратов широко применяется ПВП. В качестве плюсов его применения можно упомянуть легкую растворимость в спирте и воде. Помимо этого, они совершенствуют растворение, биологическую доступность препаратов. Причиной является формирование водорастворимых комплексов.
Этанол	ГОСТ Р 51652- 2000	Спирт этиловый	Жидкость, которая отличается легкой подвижностью, прозрачностью, обладает определенным запахом, вкус обжигающий. Вещество отличается летучестью. Этиловый спирт может играть роль растворителя для многих препаратов. Применяется для фармацевтики, с целью изготовления гранулятов. Играет роль связующего вещества.

После определения технологических характеристик, нами были выбраны следующие ВВ: PROSOLVSMCC® 90 LM (JRS PHARMA GmbH&Co. KG, Германия), Vivapur® 101 (JRS PHARMA GmbH&Co. KG, Германия), Vivapur® 103 (JRS PHARMA GmbH&Co. KG, Германия), лактоза (Panreac, Испания), LYCATAB® C (Roquette, Франция), LYCATAB® PGS (Roquette, Франция). В таблице 27 можно увидеть результаты, полученные в рамках экспериментов, касающихся установления технологических параметров.

Таблица 27 - Технологические характеристики ВВ (наполнителей)

Наименование	Насыпная плотность	Насыпная плотность после утряски, г/см ³	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса, °	Carr Index, %	Hausner Ratio
PROSOLV SMCC® 90 LM	0,38±0,03	0,47±0,04	3,9±0,02	31,5±0,01	19,1	1,24
VIVAPUR® 101	0,32±0,03	0,39±0,03	1,3±0,02	31,6±0,02	17,9	1,22
VIVAPUR® 103	0,29±0,02	0,34±0,02	3,5±0,03	33,4±0,02	14,7	1,17
Лактоза	0,55±0,03	0,95±0,03	0,6±0,04	49±0,03	42,1	1,72
LYCATAB®C	0,65±0,02	0,83±0,04	4,7±0,05	36,2±0,04	21,7	1,28
LYCATAB®PGS	0,75±0,03	0,91±0,03	5,1±0,04	33±0,05	17,6	1,21

При анализе наполнителей, установлено существенное влияние структуры на технологические свойства ВВ.

Данные таблицы 25 показывают, что наполнитель марки PROSOLV SMCC® 90 LM, Vivapur® 101, Vivapur® 103 и LYCATAB®PGS имеют «хорошую» сыпучесть, LYCATAB®C – «удовлетворительную» сыпучесть, а лактоза – «неудовлетворительную». Насыпная плотность после утряски изученных наполнителей находилась в пределах от 0,39±0,03 до 0,95±0,01 г/см³, при этом наибольшее значение показателя отмечено у лактозы.

4.1.4 Подбор режима гранулирования и создание составов, предназначенных для грануляции

Обобщив фармакологические особенности сухих экстрактов падуба парагвайского, элеутерококка колючего и субстанции-порошка янтарной кислоты, для последующих экспериментов выбору подлежала смесь этих активных веществ в соотношении 5:2:1.

Ранние эксперименты показали, что ВВ улучшили сыпучесть и насыпную массу сухих экстрактов [36, 100, 220, 245]. Поэтому целенаправленно было исследовать и точно определить количество ВВ, позволяющих приготовить массу пригодную для капсулирования, а также подобрать режим гранулирования.

Для выбора режима гранулирования были разработаны варианты смеси АВ и ВВ в % соотношении $\approx 70:30$, которые представлены в таблице 28. В виде увлажняющих растворов подбирались растворы с различной концентрацией и растворимых веществ.

Таблица 28 - Смеси для грануляции, подлежащие исследованию

№	Состав смеси АВ и ВВ для гранулирования	
1	Сумма активных веществ – 68,9%; Лактоза – 10,1%; LYCATAB [®] С – 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 [®] С – 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%.

Навески активных веществ (экстракты падуба парагвайского сухой, элеутерококка колючего сухой и янтарная кислота) и ВВ засыпали в чашу лабораторного гранулятора GLATT TDG (Glatt, Германия) вместимостью 1 л, фиксировали крышку посредством зажима, который имеет накатку. Это необходимо было сделать таким образом, чтобы уплотнение нижней поверхности крышки шерметично прилегло к верхней поверхности чаши

лабораторного гранулятора. С помощью сенсорной панели задавался режим перемешивания порошка: скорость измельчителя, скорость мешалки, время перемешивания.

Технологический процесс гранулирования АВ и ВВ состоял из трех стадий. Для подбора которых были исследованы режимы работы мешалки и чопера:

№ Стадии \ Регулируемый параметр	Работа лопастей мешалки, об/мин	Работа измельчителя, об/мин	Время, мин
Стадия I	75-300	300	5-10
Стадия II	400-1000	500-2800	5-8
Стадия III	300-1000	400-2800	2-5

Стадия I связана со смешиванием таким образом: отвешенные навески ВВ загружались первыми, исключение - Aeroperl® 300 pharma. После этого следовала стадия перемешивания. Затем необходимо было добавить отвешенные навески сухих экстрактов, а также порошок янтарной кислоты. Осуществляется перемешивание до того, как смесь не станет однородной.

На стадия II в смесь помещали смачивающее вещество в количестве от 3 до 10%.

На стадии III осуществлялось добавление вещества, которое отвечало за распределение влаги - Aeroperl® 300 pharma. После этого требовалось перемешать смесь до однородности.

Выбранный режим работы смесителя – гранулятора обусловлен проведением предварительных испытаний, в рамках которых осуществлялось исследование того, насколько смесь способна демонстрировать текучесть в рамках перемешивания на протяжении получения готового гранулята.

После того, как перемешивание заканчивается, а также заканчивается гранулирование, материал подлежал выгрузке. При необходимости, осуществлялась сушка в вакуум-сушильном шкафу (Binder, Германия), при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$.

В качестве смачивающего агента для ВГ используются вода, этаноловые и/или этаноловые растворы повидона. В ходе настоящего исследования использовалась вода, а также увлажняющие растворы этанола (96%, 70%, 40%) и

этанолового раствора повидона (5% раствор ПВП в 40% растворе этилового спирта, 5% раствор ПВП в 70% растворе этилового спирта, 2% раствор ПВП в 40% растворе этилового спирта).

В ходе проведенного предварительного исследования по подбору смачивающего агента, было выявлено, что вода, как смачивающий агент, не обладал удовлетворительными свойствами. Все исследуемые составы при введении воды в количестве 17,9-19,5% от массы сухой смеси, переходили в переувлажненные агломераты с невозможностью определения их сыпучести. При введении воды в объеме 8,5-13,4% от массы сухой смеси, составы образовывались в переувлажненные гранулы, которые требовали дополнительную стадию сушки. После сушки получались хрупкие гранулы с неудовлетворительной сыпучестью. При введении воды в объеме 2,3-7,5% от массы сухой смеси, гранулирования не происходило. Степень сыпучести оставалась очень плохой.

Раствор этилового спирта в концентрации 96%, в качестве смачивающего агента, также не имел требуемых свойств для связывания. После того, как этиловый спирт испарился, формирования видимых гранул не наблюдалось. Смеси имели вид сухих, сыпучих порошков, в которых пылевые фракции имели объем 20% от массы сухой смеси. Данный процесс происходил независимо от введенного количества смачивающего агента.

При использовании в качестве увлажняющей жидкости водно-спиртовых растворов с концентрацией 70% и 40%, образовывались составы порошковые смеси неудовлетворительного качества. При использовании водно-спиртового спирта в концентрации 70% образовывались менее хрупкие гранулы по сравнению с раствором спирта с концентрацией 96%, но также не обладающие удовлетворительной степенью сыпучести гранулы, а при использовании водно-спиртового раствора с концентрацией 40%, образовывались очень большие гранулы, которые слипались, что требовало дополнительной сушки и измельчения.

Из всех используемых в исследовании водно-спиртовых растворов, лучшим смачивающим агентом оказался спирт этиловый, но для образования

гранулируемой смеси, необходимо было использовать большое количество данного смачивающего агента ($\geq 15\%$). Для уменьшения количества используемой жидкости и улучшения образования гранул, были использованы растворы ПВП с концентрацией 5 и 2%.

Составы, в которых в качестве увлажнителя использовался 5% раствор ПВП в различных концентрациях спирта, также формировали гранулы больших размеров. Они сохли долго, их необходимо было дополнительно измельчать после того, как сушка завершалась.

Использование спиртового раствора ПВП, в котором концентрация составляет 2%, вызывало создание гранул, которые обладали удовлетворительным качеством в смесях № 5, 6, 7 и 8. Однако гранулы в составах № 5 и 6 были ломкими и подлежали разрушению в рамках установления их технологических параметров. Гранулят № 8 требовал дополнительной стадии сушки (таблица 29).

Таблица 29 - Влияние увлажняющего раствора на технологические свойства гранул

№ состав а смеси	Увлажняющий агент	Количество увлажняющего агента, %	Визуальная оценка гранул	Степень сыпучести
1-8	Вода	18,1; 19,5; 18,3; 18,6; 19,2; 18,3; 18,4; 17,9	Переувлажненные агломераты	Очень плохая
		13,4; 10,2; 11,9; 8,5; 12,9; 9,3; 10,8; 13,1	Гранулы, есть переувлажненные	
		5,5; 6,2; 7,5; 4,3; 2,3; 6,1; 5,7; 7,5	Гранулирование не произошло	
1-8	96% раствор этилового спирта	17,9; 19,3; 18,5; 18,5; 19,4; 18,6; 18,5; 17,7	Неувлажненная масса	Очень плохая
		13,2; 10,4; 11,8; 8,7; 12,9; 9,5; 10,5; 13,4		
		5,3; 6,4; 7,7; 4,1; 2,5; 6,2; 5,7; 7,4		
1-8	70% раствор этилового спирта	17,8; 19,1; 18,6; 18,5; 19,4; 18,6; 18,5; 17,7	Гранулы, есть пыль	Плохая
		13,3; 10,2; 11,6; 8,7; 12,7; 9,4; 10,4; 13,2	Хрупкие гранулы	
		5,5; 6,2; 7,9; 4,2; 2,4; 6,5; 5,3; 7,2	Хрупкие гранулы	

Продолжение Таблицы 29

1-8	40% раствор этилового спирта	17,5; 19,1; 18,0; 18,4; 19,8; 18,3; 18,8; 17,0	Гранулы, есть переувлажненные	Неудовлетворительная
		13,0; 10,2; 11,1; 8,2; 12,7; 9,0; 10,1; 13,5	Гранулы, есть пыль	
		5,0; 6,1; 7,3; 4,2; 2,8; 6,2; 5,5; 7,0	Хрупкие гранулы	
1-8	5% раствор ПВП в 70% растворе этилового спирта	16,1; 19,3; 18,8; 18,2; 19,0; 18,3; 18,5; 17,0	Переувлажненные агломераты	Очень плохая
		13,2; 10,4; 11,0; 8,5; 12,8; 9,4; 10,5; 13,2	Крупные гранулы	
		5,6; 6,3; 7,6; 4,4; 2,4; 6,0; 5,3; 7,0	Крупные гранулы	
1-8	5% раствор ПВП в 40% растворе этилового спирта	17,1; 19,0; 18,4; 18,0; 19,1; 18,2; 16,2; 17,3	Переувлажненные агломераты	Очень плохая
		11,2; 11,8; 11,0; 8,4; 12,2; 9,6; 10,4; 13,7	Крупные гранулы	Плохая
		5,0; 6,4; 7,7; 4,8; 2,5; 6,0; 5,5; 7,0	Переувлажненные гранулы	Плохая
1-8	2% раствор ПВП в 40% растворе этилового спирта	17,4; 19,0; 18,6; 18,7; 19,6; 18,2; 18,9; 17,0	Переувлажненные гранулы	Плохая
		13,0; 10,4; 11,6; 8,8; 12,7; 9,7; 10,6; 13,5	Гранулы	Удовлетворительная
		5,2; 7,8; 4,3; 4,5; 5,7; 6,2; 2,9; 3,6	Гранулы	Хорошая

При подборе режимов работы измельчителя и мешалки, было отмечено, что: на первой стадии не целесообразно использование высокой скорости т.к. смесь хорошо смешивается при низких оборотах мешалки и измельчителя; на второй и третьей стадиях скорость измельчителя при оборотах 300-700 об/мин не гранулирует смесь, а при высоких оборотах, таких как 2500-2800 об/мин вызывает дополнительное трение частиц смеси и тем самым нагревает смесь в лабораторном реакторе. Под воздействием силы трения, наблюдалось слипание гранулируемой смеси в крупные, неизмельчаемые агломераты с появлением специфического запаха жженого сахара.

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

№ Стадии	Регулируемый параметр	Работа лопастей мешалки, об/мин	Работа измельчителя, об/мин	Время, мин
I стадия		300	300	5
II стадия		1000	1800	8
III стадия		1000	2000	2

Исследование полученных гранул в соответствии с их характеристиками, такими как вид, уровень сыпучести, наличие целевой фракции, указывало на то,

что наиболее подходящий по размеру гранул уровень сыпучести демонстрирует гранулят №7, получение которого было осуществлено с применением в роли вспомогательных компонентов: Vivapur® 103, Vivasol®GF и Vivastar®P, а в качестве увлажнителя 2% раствор ПВП в 40% водно-спиртовом растворе спирта этилового, имеющие следующий состав: экстракт падуба парагвайского сухой – 43,1%; экстракт элеутерококка колючего сухой – 17,2%; субстанция-порошок янтарной кислоты – 8,6%; целлюлоза микрокристаллическая – 23%; натрия крахмал гликолят – 4%; кроскармелоза натрия – 3,1%; гранулированный оксид кремния – 1%; 2% раствор ПВП в 40% водно-спиртовом растворе спирта этилового – до 3% от массы смеси в сухом виде (рисунок 31).



Рисунок 31 - Внешний вид гранулята смеси сухих экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего, и субстанции-порошка янтарной кислоты, полученный методом влажной грануляции

Гранулят №7 подлежал изучению в более детально. Он исследовался в соответствии с описанием, потерей в массе в рамках сушки, уровнем сыпучести, углом естественного откоса, насыпным объемом, фракционным составом. Таблица 30 содержит результаты исследований.

Таблица 30 - Технологические характеристики гранулята смеси сухих экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего, и субстанции-порошка янтарной кислоты

Показатель	Результат определения
Внешний вид	Однородный гранулят от светло-желтого до темно-коричневого цвета

Продолжение Таблицы 30

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

4.2 Технология получения ЛФ СКЭП

Гранулят, для изготовления которого применяется метод влажной грануляции, подлежал оценке с точки зрения последующего капсулирования. оценивали на возможность дальнейшего капсулирования. Для получения ЛФ был выбран гранулят сухого спиртового экстракта, обладавшего лучшими технологическими характеристиками. Как ЛФ выбраны твердые желатиновые капсулы № 00, в которых представлен состав гранулята (таблица 31).

Таблица 31 - Состав гранулята, содержание действующих и ВВ на одну капсулу

Основные вещества:	в %	в мг
Падуб парагвайский экстракт сухой	43,1	250,0
Элеутерококка колючего экстракт сухой	17,2	100,0
Янтарная кислота	8,6	50,0
Вспомогательные вещества:		
Целлюлоза микрокристаллическая (USP-NF)	23,0	133,0
Натрия крахмал гликолят (EP 7 2004 г.)	4,0	23,0
Кроскармелоза натрия (EP 7 2004 г.)	3,1	18,0
Гранулированный оксид кремния (EP 7 2004 г.)	1,0	6,0
2 % раствор ПВП в спирте этиловом 40 %*	до 3% от массы сухой порошковой смеси	0,0003
Масса содержимого капсулы	100	580

* - удаляется при высушивании.

Технологическая схема представлена на рисунке 32.

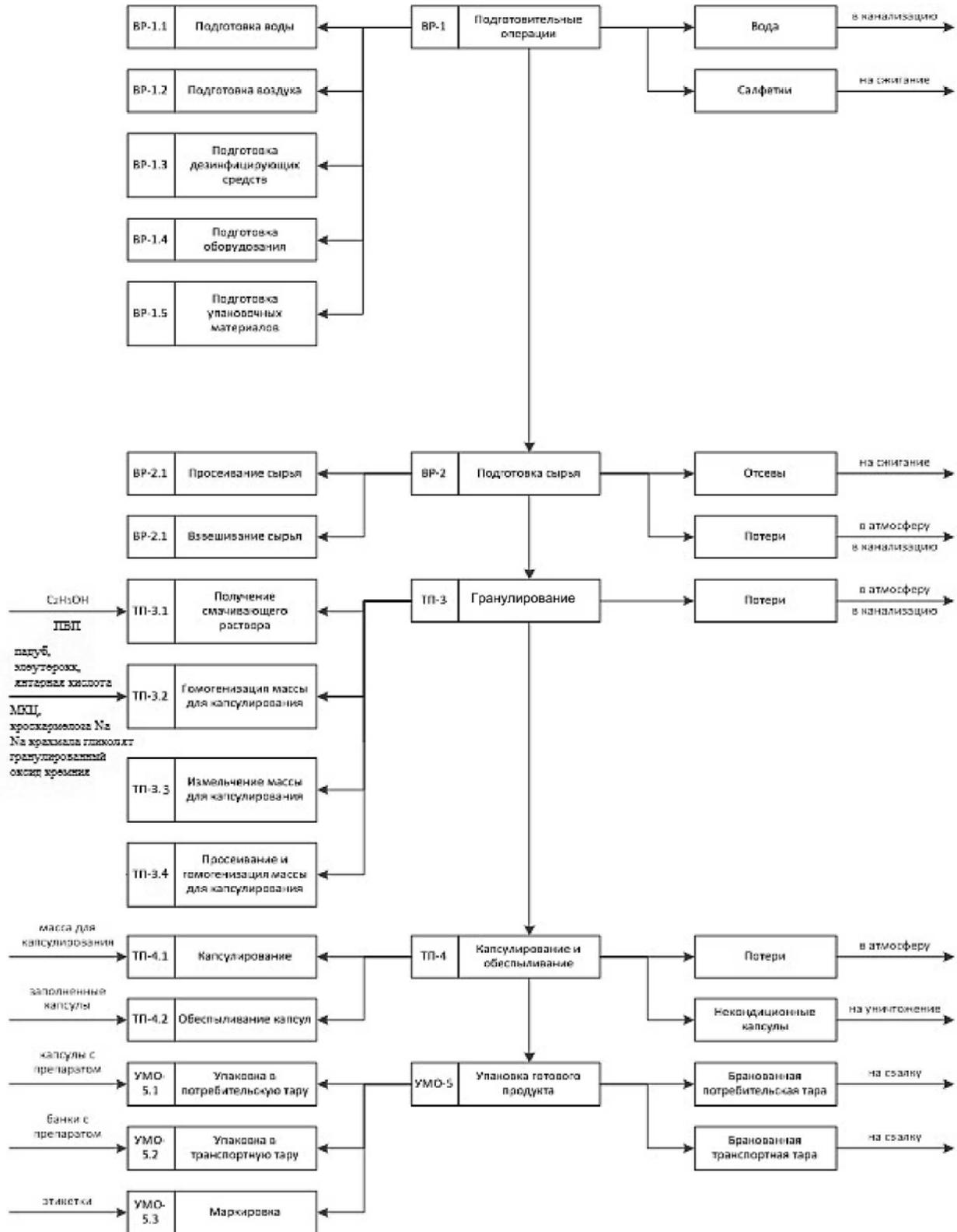


Рисунок 32 - Технологическая схема производства твердых желатиновых капсул с гранулятом смеси экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего, и субстанции-порошка янтарной кислоты, методом влажной грануляции

Технологический процесс производства гранулята смеси экстрактов падуба

парагвайского и элеутерококка колючего, и субстанции-порошка янтарной кислоты приведен на рисунке 33 и складывался из следующих стадий.

ВР-1 Вспомогательные работы

ВР-1.1 Подготовка воды

Воду очищенную отбирали из сборника (СБ-1) для определения качества (КТ-1). Качество воды очищенной должно соответствовать требованиям ФС 42-2619-97.

Получали 18 л воды дистиллированной.

ВР-1.2 Подготовка воздуха

Помещения лаборатории обеспечиваются подачей воздуха, проходящего очистку. Подача вентиляционного воздуха в помещения осуществляется с помощью системы вентиляции.

Из камеры смешения с помощью вентилятора вентиляционный воздух поступает в помещения лаборатории со скоростью от 0,3 до 0,6 м/с.

ВР-1.3 Подготовка дезинфицирующих растворов

Для приготовления 1 л 70 % раствора этилового спирта в емкость наливали 700 мл 96 % этилового спирта, 300 мл дистиллированной воды, перемешивают и сливают раствор в емкость для хранения. Допускается хранение раствора в герметично закрытой емкости в течение одного месяца.

Раствор используют для обработки поверхности оборудования (10 мл на 1 м² поверхности).

ВР-1.4 Подготовка оборудования

Обработку проводят растворами моющих средств и ополаскивают дистиллированной водой; дезинфекцию проводят после мытья 70 % этиловым спиртом.

ВР-1.5. Подготовка упаковочных материалов

Крышки моют горячим 50-60°С 0,5 % раствором моющего средства. Аналогично банкам крышки промывают горячей проточной водой и ополаскивают холодной водой очищенной. После мойки крышки сушат в сухожаровом шкафу (СШ) для сушки посуды при температуре 50-60°С в течение двух часов,

высушенные крышки хранят в закрытых пластиковых контейнерах в условиях, исключающих их загрязнение.

ВР-2 Подготовка сырья

Все сырье, используемое в производстве капсул, подвергается входному контролю в соответствии с действующей нормативно-технической документацией, для чего от каждой серии сырья отбирают средние пробы.

ВР-2.1 Просеивание сырья

Все действующие и вспомогательные вещества перед их использованием просеивают.

Просев каждого вида сырья производят отдельно.

Просеиваемые продукты засыпают осторожно, избегая пылеобразования.

Для целлюлозы микрокристаллической используют сито с диаметром отверстий 1,0 мм.

Просеянное сырье собирают в емкости, наклеивают этикетки с наименованием сырья и количеством сырья.

ВР-2.2 Взвешивание сырья

На весах взвешивают просеянное сырье

ТП-3 Гранулирование

ТП-3.1 Получение смачивающего раствора

В стакан объемом 50 мл наливают 11,5 мл этанола (96%) и при перемешивании добавляют 5 мл воды дистиллированной. К полученному раствору этанола добавляют 0,34 г поливинилпирролидона. Продолжают перемешивание до полного растворения.

ТП-3.2 Гомогенизация массы для капсулирования

В резервуар лабораторного гранулятора насыпают 249,91 г экстракта падуба парагвайского сухого, 99,94 г экстракта элеутерококка колючего сухого, 49,95 г янтарной кислоты, 132,94 г целлюлозы микрокристаллической, 22,91 г натрия крахмала гликолята, 17,96 г кроскармелозы натрия и перемешивают 5 минут до получения однородной массы.

Далее резервуар лабораторного гранулятора, к смеси действующих и ВВ,

при перемешивании порциями в течении 8 минут добавляют 17,4 мл смачивающего раствора полученного в стакане до получения однородной массы. Затем при перемешивании добавляют 5,84 г гранулированного оксида кремния в течении 2 минут.

ТП-3.3 и ТП-3.4 Измельчение, просеивание и гомогенизация массы для капсулирования

Высушенную технологическую смесь для капсулирования измельчают в ступке. Просеивают полученную массу через сито с порами 0,2 мм.

Получают 572,92 г технологической смеси для капсулирования.

В массе для капсулирования не должно быть остаточной влаги более 5,0 %.

ТП-4 Капсулирование и обеспыливание

ТП-4.1 и ТП-4.2 Капсулирование и обеспыливание

Для помещения вещества в твердые желатиновые капсулы использовали машину для наполнения капсул ручного типа (ACG – Ram MF-30, Индия). При этом проверяли среднюю массу капсул, взвешивая их на аналитических весах.

УМО-5 Упаковка готового продукта

Упаковку готовых капсул осуществляли в банки полимерные, изготовленные из полимерных материалов, разрешенных к применению МЗ РФ для упаковки лекарственных средств. Свободное пространство в банке заполняли ватой медицинской гигроскопической по ГОСТ 5556-81.

4.2.1 Оценка качества твердых желатиновых капсул СКЭП

Показатели качества определяли в соответствии с ОФС.1.4.1.0005.18 «Капсулы».

Описание

Твердые желатиновые капсулы: тело капсулы белого цвета, крышечка капсулы красного цвета. Содержимое капсулы: однородный гранулят от светло-желтого до темно-коричневого цвета.

Средняя масса содержимого капсулы

Капсулы, которые не вскрыты, обладали средней массой - $0,683 \pm 0,042$ г,

отклонение каждой из двадцати капсул, которые подлежали исследованию, составило менее $\pm 7,5 \%$.

Содержимое капсул обладало средней массой $0,576 \pm 0,039$ г, отклонение от средней массы каждой из двадцати капсул, подлежащих исследованию, было менее допустимого значения.

Подлинность

Для определения подлинности субстанции-порошка янтарной кислоты, была использована реакция с резорцином. К 0,1 г порошка добавляли 0,01 г резорцина, 1 мл концентрированной кислоты серной, нагревали 5 минут при температуре 130°C . Осуществлялось охлаждение до комнатной температуры. Затем производилось добавление 5 мл 10% раствора натрия гидроксида, возникала интенсивная желто-зеленая флуоресценция.

Методом ТСХ определяли подлинность кофеина (фиолетовое окрашивание, $R_f=0,60$) и элетутерозида В (бледно-голубое окрашивание, $R_f=0,64$).

Количественное определение

Отобранные для исследования капсулы в количестве двадцати штук подлежали вскрыванию, из них удаляли содержимое. После этого гранулят подлежал перемешиванию. Из него брали точную навеску 237,8 мг - 41 мг экстракта элеутерококка колючего. Осуществлялось помещение навески в колбу, емкость которой составляла 5 мл. Далее сюда же помещалось 1,5 метилового спирта 13%. Смесь встряхивали до того, пока она полностью не растворялась. Затем при помощи аналогичного растворителя объем доводился до метки. Полученный раствор встряхивали в течении 15 минут и фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 9 микрон.

Количественное содержание суммы элеутерозидов В и Е, кофеина и янтарной кислоты устанавливали в соответствии с методом из главы 2 «Материалы и методы».

Растворение

Как видно из рисунка 33, в используемой среде растворения, среднее значение количества элеутерозида В, высвободившегося в течение 15 мин из

исследуемого лекарственного средства составило $77,82 \pm 0,32\%$; кофеина - $90,41 \pm 0,34\%$; янтарной кислоты - $96,33 \pm 0,26\%$.

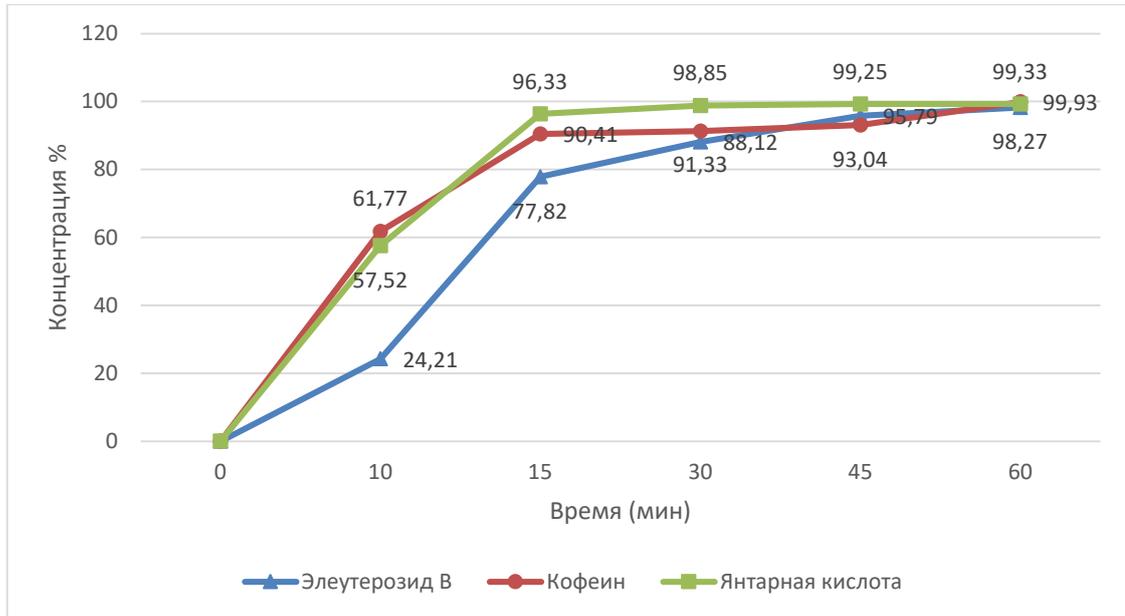


Рисунок 33 - Результат высвобождения элеутерозида В, кофеина и янтарной кислоты из ЛФ СКЭП

Таким образом, в представленной среде растворения профиль исследуемой лекарственной формы в течение 15 минут выходил на уровень полного высвобождения (т.е. более 75 %) или плато.

Распадаемость

Время, необходимое для того, чтобы твердые желатиновые капсулы СКЭП полностью распались, составило $10,9 \pm 0,2$ минут [39].

Установление сроков стабильности

Результаты исследования, направленного на то, чтобы установить сроки годности препаратов, которые наблюдались в естественных условиях, можно увидеть в таблице 32.

Таблица 32 - Показатели качества ЛФ СКЭП, находящихся на хранении в естественных условиях

Показатели качества		Сроки хранения, месяцы (при температуре 20±2°С, относительной влажности 65±5%)								
		Исходно	3	6	9	12	15	18	21	24
Описание	Капсулы твердые желатиновые: тело капсулы белое, крышечка капсулы красная. Содержимое капсулы: однородный гранулят от светло-желтого до темно-коричневого цвета.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Средняя масса	Невскрытых капсул: 0,683±10% Содержимое капсул: 0,576±10%	0,683±0,042 г 0,576±0,039 г	Соотв.							
Подлинность	1) Качественная реакция с резорцином 2) ТСХ на кофеин 3) ТСХ на элеутерозид В	1) Красно-коричневое окрашивание раствора, которое переходит при подщелачивании в оранжево-желтый цвет с интенсивной желто-зеленой флуоресценцией 2) Зона с фиолетовым окрашиванием (Rf=0,60) 3) Зона с бледно-голубым окрашиванием (Rf=0,64)	Соотв.							
Количественное определение	ВЭЖХ от 0,6 до 0,9% кофеина	0,86±0,04%	0,86±0,04	0,86±0,04	0,85±0,04	0,85±0,04	0,84±0,03	0,84±0,04	0,82±0,04	0,82±0,04
	ВЭЖХ от 0,3 до 0,66% суммы элеутерозидов В и Е	0,62±0,04%	0,61±0,03	0,61±0,04	0,62±0,04	0,60±0,03	0,61±0,04	0,59±0,03	0,56±0,04	0,54±0,03
	ВЭЖХ от 7 до 8,7% янтарной кислоты	8,4±0,3%	8,4±0,3%	8,3±0,3	8,3±0,3	8,2±0,3	8,1±0,3	8,1±0,4	8,1±0,3	8,1±0,4
Распадаемость	100 %, за не более чем 20 мин	10,9±0,2 мин	10,9±0,3	11,3±0,3	11,4±0,2	11,7±0,1	11,6±0,2	12,5±0,3	12,8±0,4	13,3±0,3

На 24 месяце капсулы СКЭП соответствовали требованиям значений проекта НД (твердые желатиновые капсулы с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой) при температуре хранения $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ и влажности $65\pm 5\%$. Количественное содержание основных действующих веществ изменялось в допустимом интервале значений (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). Скорость распадаемости капсул находилась также в интервале допустимых отклонений (100% за не более чем 20 минут). Исследование сроков годности позволяет утвердить рекомендуемый срок хранения: не более 2 лет при температуре не выше 25°C .

Показатели и нормы качества для ЛФ СКЭП, представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Показатели и нормы качества для твердых желатиновых капсул с сухими экстрактами падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой

Показатель качества	Методы испытания	Регламентируемый параметр
Описание	Органолептический	Капсулы твердые желатиновые: тело капсулы белое, крышечка капсулы красная. Содержимое капсулы: однородный гранулят от светло-жёлтого 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	от 0,6 до 0,9% кофеина
	ВЭЖХ	от 0,3 до 0,66% суммы элеутерозидов В и Е
	ВЭЖХ	от 7 до 8,7% янтарной кислоты

Продолжении Таблицы 33

Распадаемость	ОФС.1.4.2.0013.15	10,9±0,2 мин
Растворение	ОФС.1.4.2.0014.15	Элеутерозид В - 77,82±0,32% Кофеин - 90,41±0,34% Янтарная кислота - 96,33±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	

Таким образом, капсулы соответствуют требованиям качества, предъявляемые ГФ XIV. Величина параметров, которые описывают уровень биофармацевтической доступности капсул, указывает на то, что имеет место оптимальная технология и выбор ВВ в процессе изготовления капсул, заполненных гранулятом из смеси сухих экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего и субстанции-порошка янтарной кислоты.

Выводы к главе 4

1. Получен гранулят из смеси сухих экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего и субстанции-порошка янтарной кислоты методом ВГ, позволяющий применять вспомогательное вещество в минимальном количестве, а также получить готовый продукт высокого качества. При этом возможно исключить использование термической сушки.

2. Научно обоснован, а также подтвержден в соответствии с исследованиями оптимальный состав твердых желатиновых капсул 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 40% 0,0003 мг (до 3% от массы сухой порошковой смеси).

3. Выбрана лекарственная форма в виде твердых капсул из желатина, удобная для применения. Разработана схема изготовления твердых желатиновых капсул СКЭП.

4. Были предложены показатели, а также зафиксированы требования качества для твердых желатиновых капсул: описание, средняя масса невскрытых капсул ($0,683 \pm 0,042$ г), средняя масса содержимого капсул ($0,576 \pm 0,039$ г), подлинность, количественное определение кофеина ($0,62 \pm 0,04\%$), распадаемость ($10,9 \pm 0,2$ мин), растворение ($96,33 \pm 0,26\%$), микробиологическая чистота (категория 3А), по стандартным методам.

5. Стабильность полученной лекарственной формы, была изучена при температуре хранения $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности $65 \pm 5\%$. Капсулы СКЭП остаются годными на протяжении 2 лет.

ОБЩИЕ 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, теofilлин), 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%, теofilлина - 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».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОА	–	антиоксидантная активность
БАВ	–	биологически-активное вещество
ВВ	–	вспомогательное вещество
ВГ	–	влажное гранулирование
ВДА	–	вертикальная двигательная активность
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГДА	–	горизонтальная двигательная активность
ГСО	–	государственный стандартный образец
ДМСО	–	диметилсульфоксид
КВП	–	коэффициент водопоглощения
ЛРС	–	лекарственное растительное сырье
ЛФ	–	лекарственная форма
МОТ	–	международная организация труда
МЕ	–	международные единицы
МКЦ	–	микrokристаллическая целлюлоза
НД	–	нормативная документация
ПАВ	–	поверхностно активные вещества
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
СКЭП	–	средство коррекции с экстрактом падуба парагвайского, элеутерококка колючего и янтарной кислотой
СО	–	стандартный образец
УФ	–	ультрафиолетовый спектр
ТСХ	–	тонкослойная хроматография
$K_{\text{погл}}$	–	коэффициент поглощения
ОФС	–	общая фармакопейная статья
ПВП	–	поливинилпирролидон
ФС	–	фармакопейная статья
ФСП	–	фармакопейная статья предприятия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, К.В. Технология самоэмульгирующихся систем доставки лекарственных веществ / К.В. Алексеев, К.Г. Турчинская, Е.В. Блынская, Н.В. Тихонова // ВНМТ. – 2014. – №1. – С.128-133
2. Аляутдин, Р.Н. Стресс-протекторная фитотерапия / Р.Н. Аляутдин, М.Д. Гусейнов, И.Н. Зильфикаров, Б.К. Романов // Биомедицина. – 2011. – №3. – С.115-119
3. Асфура, Т. Разработка состава и технологии таблеток с экстрактом *Boswellia serrata*: дис. ... канд. фармац. наук : 14.04.01 / Асфура Тарек. – М., 2013. – 108 с.
4. Аутлов, С.А. Микрокристаллическая целлюлоза: структура, свойства и области применения (обзор) / С.А. Аутлов, Н.Г. Базарнова, Е.Ю. Кушнир // Химия растительного сырья. – 2013. – №3. – С.33-41
5. Бабанов, С.А. Поражения сердечно-сосудистой системы в практике врача-профпатолога / С.А. Бабанов, Р.А. Бараева, Д.С. Будащ // Медицинский альманах. – 2016. – №4. – С.106-111
6. Бадалян, З. В. Суммарные фитопрепараты подорожника большого возможности совершенствования технологии / З.В. Бадалян, Э.Ф. Степанова, А.М. Темирбулатова, И.Н. Зилфикаров // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – №22. – С.125-130
7. Бальхаев, И.М. Влияние фитоадаптогена «полифитотон» на структуру надпочечников белых крыс при иммобилизационном стрессе / И.М. Бальхаев, И.К. Шантанова, К.С. Иванова, Л.Н. Лоншакова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – №1-2. – С.142-144
8. Барановский, А.Ю. Белково-энергетическая недостаточность у больных пожилого и старческого возраста с гастродуоденальными язвами в послеоперационном периоде / А.Ю. Барановский, О.Б. Протопопова // Практическая медицина. – 2014. – №1. – С.35-40
9. Барышникова, М.А. Разработка новой лекарственной формы галавита в виде сублингвальных таблеток / М.А. Барышникова, О.Л. Орлова, З.С. Шпрах, Е.М. Уколова, А.П. Полозкова, С.А. Партолина, Л.Н. Жилова, Л.П. Юдина, Н.А.

- Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – №1. – С.86-90
10. Белоусов, Е.А. Формирование рационального ассортимента лекарственных препаратов, обладающих адаптогенной активностью / Е.А. Белоусов, О.В. Белоусова, Д.С. Марцева // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2016. – №19.– С.125-130
11. Береза, Н.С. Микроскопическое изучение листьев падуба парагвайского / Н.С. Береза, Н.С. Голикова, Т.Ю. Ковалева, Л.А. Павлова, Н.Н. Сапронова // Фармация. – 2011. – № 8. – С. 15-17
12. Береза, Н.С. Стандартизация сырья Падуба парагвайского. Часть 1. Разработка методики определения метилксантинов в сырье падуба парагвайского и проведение сравнительного анализа состава сырья / Н.С. Береза, Е.А. Родионова, Л.А. Павлова, А.Е. Коваленко, Д.А. Кардонский, А.А. Еганов // Бутлеровские сообщения. – 2012. – №11. – С.81-84
13. Бибик, И.В. Перспективы использования экстракта из хвои сосны обыкновенной в производстве функциональных напитков / И.В. Бибик, Ю.А. Глинёва // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – №1. – С.9-13
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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

18. 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
19. Бобок, М.Н. Разработка технологии получения и стандартизация сухих экстрактов *Ilex 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
20. 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
21. 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
22. Боровкова, Т.А. Состояние перекисного окисления липидов при разных сочетаниях цереброваскулярной и коронарной патологии у пожилых / Т.А. Боровкова, Н.В. Матвейчук, В.С. Мякотных // Тюменский медицинский журнал. – 2014. – №2. – С.65-66
23. Брунеман, Д. Требования для современных наполнителей / Д. Брунеман // Материалы форума «Фармтехпром 2006». – 2006. – С.24
24. Бузунов, Р.В. Джетлаг: новый термин - новые подходы / Р.В. Бузунов, Е. В. Царева // Русский медицинский журнал. – 2013. – № 16. – С.831-837
25. Бурчаков, Д.И. Суточный ритм секреции и метаболические эффекты мелатонина / Д.И.Бурчаков // Ожирение и метаболизм. – 2015. – №1. – С.46-51
26. Бухтияров, И.В. Профессиональный стресс в результате сменного труда как фактор риска нарушения здоровья работников / И.В. Бухтияров, М.Ю. Рубцов, О.И. Юшкова // Анализ риска здоровью. – 2016. – №3. – С.110-121
27. Васенина, Е.Е. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии / Е.Е. Васенина, О.С. Левин // СТПН. – 2013. – №3-4. – С.39-46

28. Вахитов, Х.М. Обменные нарушения при патологии органов дыхания у детей и пути их коррекции с помощью солей янтарной кислоты / Х.М. Вахитов, Н.Н. Симонова, Е.В. Генералова, Л.Ф. Вахитова, Ж.Р. Ибрагимова, Н.В. Оленев // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – №2. – С.236-238
29. Волобуев, А.Н. Циркадианная биофизика и хрономедицина / А.Н. Волобуев, В.Ф. Пятин, Н.П. Романчук // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – №5. – С.97-100
30. Воронина, Т.А. Роль оксидативного стресса и антиоксидантов при дезадаптации различного генеза / Т.А.Воронина // Фармация и фармакология. – 2015. – № 5s. – С.8-17
31. Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре И-42-2-82, Минздрав СССР, Москва. 1983.– 13 с.
32. Гаммель, И.В. Сравнительное изучение возможности промышленного капсулирования осетрового жира Витойл капельным и ротационно-матричным методами / И.В. Гаммель, Л.И. Запорожская, П.Т. Петров // Медицинский альманах. – 2013. – №1. – С.188-191
33. Гаранина, О.А. Особенности организации времени жизни специалистов, работающих в режиме сменного графика / О.А.Гаранина // Организационная психология. – 2015. – №2. – С.10-25
34. Гарнов, И.О. Пихтовые экстракты как средство повышения физиологических резервов организма / И.О. Гарнов, А.В. Кучин, Н.К. Мазина, Е.М. Карпова, Е.Р. Бойко // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2014. – №3. – С.44-52
35. Глухих, В.Р. Особенности применения теории биоритмов в антропологистике / В.Р. Глухих // СТЭЖ. – 2012. – №16. – С.17-19
36. Глызин, В.И. Сибектан – комплексный растительный гепатопротектор» / В.И. Глызин, Т.А. Сокольская, Т.В. Качалина, В.Ф. Охотникова, Н.В. Тареева, А.А. Кирьянов // Сб. научн. трудов, посвященный 70-летию ВИЛАР.– 2000.– С.37-41
37. Государственная фармакопея (ГФ) РФ. XII издание. – М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. –704 с.

38. Государственная фармакопея (ГФ) РФ. XIII издание. – М.: ФЭМБ, 2015. – 1294 с.
39. Государственная фармакопея (ГФ) РФ. XIV издание. – М.: ФЭМБ, 2018. – 7019 с.
40. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
41. Губин, Д.Г. Возрастной десинхроноз: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Губин // Тюменский медицинский журнал. – 2014. – №2. – С.66-68
42. Гунина, Л.М. Безопасность и эффективность янтарной кислоты при использовании спортсменами для стимуляции работоспособности / Л.М.Гунина // Здоровье для всех. – 2014. – №2. – С.10-14
43. Гусев, П.В. Влияние способа экстракции на состав и выход хмелевого экстракта / П.В. Гусев, В.Е. Струкова, В.Т. Христюк // Известия ВУЗов. Пищевая технология.– 2011.– №4.– С.15-17
44. Датиева, В.К. Перспективы применения мелатонина в клинической практике / В.К. Датиева, Е.Е. Васенина, О.С. Левин // СТПН. – 2013. – №1. – С.47-51
45. Датиева, В.К. Применение мелатонина при нарушении сна / В.К. Датиева, Е.А. Ляшенко, О.С. Левин // СТПН. – 2015. – №1. – С.36-40
46. Демина, Н.Б. Разработка рецептуры и технологии таблеток с экстрактом босвеллии / Н.Б. Демина, М.Н. Анурова, Т. Асфура // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 3. – С.12-20
47. Доровских, В.А. Коррекция холодового воздействия с помощью препарата, содержащего янтарную кислоту / В.А. Доровских, Н.В. Симонова, Ю.В. Доровских // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – №49. – С.82-86
48. Доровских, В.А. Антиоксидантные свойства препаратов на основе янтарной кислоты при тепловом воздействии на организм / В.А. Доровских, О.Н. Ли, Н.В. Симонова, М.А. Штарберг, В.Ю. Доровских // ТМЖ. – 2014.– №2. – С.53-55
49. Другова, Е.С. Влияние стресса на физиологические и биохимические показатели эритроцитов крыс и их коррекция экстрактом из морской бурой

водоросли *Saccharina japonica* / Е.С. Другова, Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Фоменко, В.Г. Спрыгин, Т.В. Момот, Л.Н. Лесникова, В.Ю. Мерзляков // IN SITU. – 2015. – №3. – С.115-117

50. Дуров, А.М. Сравнительный анализ циркадианных ритмов показателей кардиореспираторной системы и биологического возраста у лиц, проживающих на юге и севере Тюменской области / А.М. Дуров, Д.Г. Губин, В.Л. Денежкина, М.А. Назаренко // Фундаментальные исследования. – 2015. – №1-4. – С.730-734

51. Евглевский, А.А. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты / А.А. Евглевский, Г.Ф. Рыжкова, Е.П. Евглевская, Н.В. Ванина, И.И. Михайлова, А.В. Денисова, Н.Ф. Ерыженская // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – №9. – С.67-69

52. Егошина, Ю.А. Современные вспомогательные вещества в таблеточном производстве / Ю.А. Егошина, Л.А. Поцелуева // Успехи современного естествознания. – 2009. – №10. – С.30-33

53. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). – М. – 2010. – 357 с.

54. Ежов, С.Н. Основные концепции биоритмологии / С.Н.Ежов // Вестник ТГЭУ. 2008. – №2. – С.104-121

55. Жукова, О.Б. Влияние экспериментального десинхроноза на липидный обмен у крыс при ожирении / О.Б. Жукова, К.В. Зайцев, Н.П. Степаненко, А.А. Гостюхина, С.С. Гутор, И.И. Вебер, Д.А. Нимирская, С.А. Межеричский, Н.Г. Абдулкина // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. – 2013. – №4. С.145-151

56. Загускин, С.Л. Биологическое время: саморегуляция и управление / С.Л. Загускин // Пространство и Время. – 2015а. – №4. – С.254-266

57. Загускин, С.Л. Хронодиагностика и хронотерапия когнитивных нарушений атеросклеротического генеза у пожилых людей / С.Л. Загускин, Д.В. Бакузова // Клиническая медицина. – 2015б. – №10. – С.39-43

58. Задумина, Е.В. Хронофармакологические аспекты влияния препарата "Мелаксен®" (мелатонин) на физиологические показатели у лиц пожилого и

старческого возраста: дис... канд. мед. наук : 14.00.25 / Задумина, Елена Викторовна. – Тюмень, 2005. – 136 с.

59. Застрожин, М.С. Десинхроноз как проявление нормы и патологии / М.С. Застрожин, Р.К. Агарвал, С.М. Чибисов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2012. – №2. – С.51-54

60. Захарчук, А.И. Взаимосвязь расстройств хроноструктуры циркадианных ритмов и нарушений цикла «Сон-бодрствование» / А.И.Захарчук // Молодий вчений. – 2014. – №10. – С.94-97

61. Иванов, А.А. Адаптогенные эффекты янтаря и маточного молочка пчел при стрессе животных / А.А. Иванов, Р.Т. Маннапова, Р.А. Рапиев // Известия ТСХА. – 2014. – №5. – С.60-70

62. Каладзе, Н.Н. Итоги и перспективы изучения физиологических, патогенетических и фармакологических эффектов мелатонина / Н.Н. Каладзе, Е.М. Соболева, Н.Н. Скоромная // Здоровье ребенка. – 2010. – №2. – С.156-165

63. Каплан, Е.Я. Оптимизация адаптивных процессов организма / Е.Я.Каплан, О.Д. Цыренжапова, Л.Н. Шантанова. – М.: Наука, 1990. – 94 с.

64. Каркищенко, В.Н. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов / В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, С.Е. Деньгина, Н.В. Станкова // Биомедицина. – 2011. – №1. – С. 72-74

65. Катинас, Г.С. Актуальные термины современной хронобиологии / Г.С. Катинас, С.М. Чибисов, Р.К. Агарвал // Здоровье и образование в XXI веке. – 2015. – №1. – С.4-11

66. Катинас Г.С. Нарушения структуры хронома / Г.С. Катинас, С.М. Чибисов // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2012. – №7.– С.122-123

67. Кику, П.Ф. Проблемы трансмеридиональных перелетов / П.Ф. Кику, М.Ю. Хотимченко, Л.Н. Нагирная // Экология человека. – 2015. – №1. – С.15-20

68. Ковальзон, В.М. Цикл бодрствование-сон и биоритмы человека при различных режимах чередования светлого и темного периода суток / Ковальзон В.М., Дорохов В.Б. // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – №1-4. – С.151-

162

69. Корепанов, С.В. Применение лекарственных растений с иммуномодулирующими свойствами в онкологии / С.В. Корепанов, Т.Г. Опенко // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – №4. – С.15-20
70. Костенко, Е.В. Десинхроноз как один из важнейших факторов возникновения и развития цереброваскулярных заболеваний / Е.В. Костенко, Т.М. Маневич, Н.А. Разумов // Лечебное дело. – 2013. – №2. С.104-116
71. Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко. – К.: Выща школа, 1989. – 447 с.
72. Крендаль, Ф.П. Сравнительная характеристика препаратов из группы фитоадаптогенов – женьшеня, элеутерококка и родиолы розовой / Ф.П. Крендаль, С.В. Козин, Л.В. Левина. – М.: Профиль, – 2007. – 392 с.
73. Кролевец, А.А. Свойства наноструктурированных адаптогенов растительного происхождения / Кролевец А.А., Андреенков В.С., Воронцова М.Л. // Educatio. – 2015. – №7-2. – С.138-141
74. Круглова, О.Г. Сравнительная характеристика влияния дигидрокверцетина и витамина е на продукты перекисного окисления липидов в крови лабораторных животных при холодовом воздействии / О.Г. Круглова, В.А. Доровских, В.И. Тиханов, Т.Г. Круглова, И.А. Бочарникова, Д.П. Решодько // Бюл. физ. и пат. дых. – 2011. – №40. – С.71-73
75. Кунижев, С.М. Новые технологии в производстве молочных продуктов / С.М. Кунижев, В.А. Шуваев. – М.: Де Ли принт, 2004. – 203 с.
76. Курбатова, И.В., Циркадные гены и сердечно-сосудистые патологии / Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Немова Н.Н. // Труды КарНЦ РАН. – 2014. – №5. – С.3-17
77. Левин, Я.И. Мелатонин и неврология / Я.И.Левин // Регулярные выпуски «РМЖ». – 2007. – №24. – С.1851
78. Леонова, М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие / М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2012. – 118 с.

79. Лефтерова, М.И. Влияние способа таблетирования на качество таблеток антигистаминного препарата последнего поколения / Лефтерова М.И., Камаева С.С., Анисимов А.Н., Меркурьева Г.Ю., Кашапова К.И. // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013. – №2. – С.642-643
80. Лещанкина, Н.Ю. Сравнительный анализ влияния антиоксидантов на липидный обмен миокарда при хирургическом эндотоксикозе / Н.Ю. Лещанкина, Э.И. Полозова, О.Г. Радайкина, В.В. Васильев, С.А. Турыгина, Т.Ю. Паршкова // Фундаментальные исследования. – 2014. – №4-2. – С.291-295
81. Ли, О.Н. Коррекция окислительного стресса цитофлавином при тепловом воздействии на организм / О.Н. Ли, Ю.А. Доровских, М.А. Штарберг, В.Ю. Доровских, Н.В. Симонова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2014. – №2. – С.89-93
82. Литвин, Ф.Б. Перспективы использования препарата женьшеня для расширения функциональных возможностей системы микроциркуляции при мышечной деятельности / Ф.Б. Литвин, М.А. Аверьянов // Ученые записки университета Лесгафта. – 2014. – №12. – С.128-133
83. Ложкина, Г.А. Влияние различных факторов на процесс экстракции почек тополя бальзамического / Г.А. Ложкина, Е.В. Исаева, Т.В. Рязанова // Химия растительного сырья. – 2007. – №2. – С.51-54
84. Ляшенко, Е.А. Расстройства сна у пожилых пациентов / Е.А. Ляшенко, О.С. Левин, М.Г. Полуэктов // СТПН. – 2015. – №2. – С. 4-9
85. Маляренко, Т.Н. Медицина сна. Немедикаментозное лечение инсомний / Т.Н. Маляренко, А.Т. Быков, В.Г. Заика, Ю.Е. Маляренко // Медицинский вестник Юга России. – 2011. – №1. – С.23-32
86. Мендель, В.Э. Мелатонин: роль в организме и терапевтические возможности. Опыт применения препарата Мелаксен® в российской медицинской практике / В.Э. Мендель, О.И. Мендель // РМЖ. – 2010. – №6. – С.336-341
87. Меретуков, З.А. Оценка экстрагируемости растительных материалов с различной степенью подготовки / З.А. Меретуков, Е.П. Кошевой // Новые

технологии. – 2010. – №3. – С.42-45

88. Митрофанова, И.Ю., Влияние технологических факторов на эффективность экстрагирования флавоноидов из травы девясила британского (*Inula britannica* L.) / И.Ю. Митрофанова, А.В. Яницкая, В.В. Гукасова // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2014. – №4.– С.244-249

89. Мишин, Р.Г. Организационно-методические подходы к дифференциации тренировочного процесса юных лыжников-гонщиков / Р.Г.Мишин // Вестник ТГУ. – 2014. – №3. – С.117-122

90. Морозов, В.Н. К современной трактовке механизмов стресса / В.Н. Морозов, А.А. Хадарцев // ВНМТ. – 2010. – №1. – С.15-17

91. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия. Учебник, изд. 4, перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М. : Медицина, 2002. – 656 с.

92. Нагибович, О.А. Витамины и перекисное окисление липидов при сахарном диабете 2 типа / О.А. Нагибович, Л.В. Ященко, Е.В. Кузнецова, Т.И. Субботина, О.Г. Шинкарева // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013. – №1. – С.414-415

93. Нарзулаев, С.Б. Профилактика заболеваний средствами физической культуры / С.Б. Нарзулаев, В.Н. Семенов // Сибирский педагогический журнал. – 2012. – №4. – С.234-238

94. Невструев, Н.А. Активизация метаболизма и продуктивности поросят сочетанным применением гидролизатов крови свиней с янтарной кислотой: дис. ... канд. биолог. наук : 16.00.04 / Невструев Николай Анатольевич. – Краснодар, 2008. – 127 с.

95. Никитина, Е.В. Янтарная кислота и её соли как индивидуальные антиоксиданты и генопротекторы / Е.В. Никитина, Н.К. Романова // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – №10. – С.375-381

96. Одинец, А.Д. К антигипоксическому действию препаратов из растительного сырья Байкальской Сибири / А.Д. Одинец, А.И. Левента, Д.А. Щукин, О.В. Шабатурова // Сиб. мед. журн. – 2011. – №5. – С.112-115

97. Оковитый, С.В. Антигипоксанты в современной клинической практике /

С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, В.А. Заплутанов, А.Н. Смагина // Клиническая медицина. – 2012. – №9. – С.63-68

98. Осиков, М.В. Влияние мелатонина на поведенческую активность животных при десинхронозе в условиях люминесцентного освещения / М.В. Осиков, О.И. Огнева, П.О. Платковский // Здоровье и образование в XXI веке. – 2014. – №4. – С.64-65

99. Осиков, М.В. Этологический статус и когнитивная функция при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения / М.В. Осиков, О.И. Огнева, О.А. Гизингер, А.А. Федосов // Фундаментальные исследования. – 2015. – №1-7. – С.1392-1396

100. Охотникова, В.Ф. Современное состояние и перспективы развития технологии твердых лекарственных форм для внутреннего применения с растительными сухими экстрактами / В.Ф. Охотникова, Т.В. Качалина, М.В. Балакина, Д.С. Качалин, О.А. Семкина, Н.Ю. Отц, К.М. Саканян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 1. – С. 139-143

101. Павлюченко, И.И. Сравнительный анализ результатов оборачиваемости лекарственного препарата антиоксидантного действия Цитофлавин/Cytoflavin (на примере оптовых организаций региона) / И.И. Павлюченко, Н.М. Бат, Ю.С. Панасенкова // Фундаментальные исследования. – 2014. – №10-9. – С. 1781-1785

102. Полуэктов, М.Г. Нарушения сна в практике невролога / М.Г. Полуэктов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2012. – №4. – С.18-24

103. Португалов, С.Н. Восстановление организма спортсменов при изменении климатопоясных условий / С.Н. Португалов // Вестник спортивной науки. – 2003. – № 2. – С. 58-59

104. Португалов, С.Н. Специализированные биологически активные и пищевые добавки в спортивном питании / С.Н. Португалов // Вестник спортивной науки. – 2006. – №1. – С.18-22

105. Поцелуева, Л.А. Настойки и жидкие экстракты в России и в зарубежье / Л.А. Поцелуева // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их

решения. – 2012. – №2. – С.864-866

106. Пшуков, Ю.Г. Метод прогнозирования качества жидких экстрактов при их производстве способом реперколяции / Ю.Г. Пшуков, И.А. Муравьев // Фармация. – 1988. – №3. – С.19-22

107. Пшуков, Ю.Г. Методика одновременного определения коэффициентов поглощения, образования внутреннего сока и увеличения объема при растворении экстрактивных веществ / Ю.Г. Пшуков // Фармация. – 1990. – №4. – С.24-27

108. Раменская, Г.В. Разработка методики определения биологически активных веществ в сырье падуба парагвайского / Г.В. Раменская, Е.А. Родионова, О.Ю. Щепочкина, Ю.В. Медведев, И.Е. Шохин, И.Б. Каденацци, Л.В. Шустова, Л.А. Павлова // Фармация. – 2014. – №3. – С.19-23

109. Рапопорт, С.И. Хрономедицина, циркадианные ритмы. Кому это нужно? / С.И. Рапопорт // Клиническая медицина. – 2012. – №8. – С.73-75

110. Речкалов, А.В. Врачебно-педагогический контроль в физической культуре и спорте: монография / А.В. Речкалов, Д.А. Корюкин. Курган: Издательство Курганского государственного университета – 2011. – 227 с.

111. Решняк, В.И. Профессиональная деятельность работников флота в условиях хронофизиологической адаптации / В.И. Решняк, А.Г. Щуров, О.В. Витязева // Вестник государственного университета морского и речного флота им. адмирала С.О. Макарова. – 2014. – №6. – С.20-24

112. Родыгина, А.Н. Изучение влияния условий хранения и состава оболочек капсул на высвобождение активных фармацевтических субстанций / А.Н. Родыгина, И.Е. Смехова // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013. – №2. – С.649-650

113. Руководство Р 4.1.1672-03 «Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище». – М. Роспотребнадзор, 2003. – 48 с.

114. Рыжов, В.М. Исследование возможности вторичной переработки шрота травы тимьяна ползучего как отхода производства лекарственного препарата «Пертуссин» / В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Е.В. Степанова // Известия Самарского

научного центра РАН. – 2012. – №1-9. – С.2285-2287

115. Рычкова, М.А., Значение витаминов и минералов в питании пожилого человека / М.А. Рычкова, М.З. Исмаилова // Лечебное дело. – 2008. – №4. – С.48-54

116. Симонов, В.Н. Десинхроноз гемодинамических параметров при сменной работе / В.Н. Симонов, М.В. Бочкарев, О.Н. Рагозин // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2011. – №4. – С.84-89

117. Симонова, Н.В. Влияние адаптогенов растительного происхождения на интенсивность процессов перекисного окисления липидов биомембран в условиях ультрафиолетового облучения / Н.В. Симонова, В.А. Доровских, М.А. Штарберг // Дальневосточный медицинский журнал. – 2010. – №2. – С.112-115

118. Симонян, Е.В. Влияние новых лекарственных форм кислоты янтарной на процессы свободнорадикального окисления / Е.В. Симонян, Ю.В. Шикова // Успехи современного естествознания. – 2014. – №12-3. – С.231-234

119. Слесарев, С.М. Эпифизарная и тканевая регуляции временной организации пролиферации обновляющихся тканей: дис... докт. биол. наук : 03.00.25 / Слесарев Сергей Михайлович. – М., 2009. –281с.

120. Стачинский, А.Н. Анализ современного производства прессованных лекарственных форм по сравнению с пилюлями и энергоинформационными готовыми лекарственными средствами / А.Н. Стачинский // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – №1-2. – С.123-127

121. Струпан, Е.А. Технология получения экстрактов из дикорастущего растительного сырья, широко применяемого в пищевой промышленности и фитотерапии / Е.А. Струпан, В.С. Колодязная, О.А. Струпан // Вестник КрасГАУ. – 2012. – №8. – С.199-205

122. Телкова, И.Л. Профессиональные особенности труда и сердечно-сосудистые заболевания: риск развития и проблемы профилактики. Клинико-эпидемиологический анализ / И.Л. Телкова // СМЖ. – 2012. – №1.– С.17-26

123. Темирбулатова, А.М. Фитохимическое исследование и разработка технологии жидкого экстракта из листьев лимонника китайского / А.М.

- Темирбулатова, Э.Ф. Степанова, В.А. Садоян, С.В. Клочков // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – №22. С.141-144
124. Тимохина, Т.Х. Хронобиологический подход к изучению биологических свойств *Staphylococcus aureus* / Т.Х. Тимохина, Д.Г. Губин, Я.И. Паромова, М.В. Николенко // Фундаментальные исследования. – 2014. – №7-5. – С.1029-1033
125. Убеева, И.П. Фитокоррекция заболевания нервной системы / И.П. Убеева, Е.Н. Цыбикова, Я.Г. Разуваева, Н.В. Верлан, А.Н. Плеханов // Вестник БГУ. – 2013. – №12. – С.7-10
126. Успенская, Ю.А. Цитоадаптивный эффект препаратов растительного происхождения / Ю.А. Успенская // Материалы международной заочной научной конференции «Проблемы современной аграрной науки». – 2014. –С.43-46
127. Фатеева, Н.М. Биоритмологические аспекты здоровья человека в условиях Крайнего Севера при экспедиционно-вахтовой организации труда / Н.М. Фатеева // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – №6. – С.77-79
128. Федосеева, Л.М. Расчет эффективности процесса экстракции бурых листьев бадана толстолистного / Л.М. Федосеева // Химия растительного сырья. – 2000. – №1. – С.117-119
129. Федосеева, Л.М. Установление технологических параметров листьев лопуха большого / Л.М. Федосеева, М.А. Биндюк // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С.149-150
130. Федотова, О.А. Исследование процесса смачиваемости пылевидного КС1, содержащего примеси флотореагентов / О.А. Федотова, М.В. Черепанова, И.С. Потапов, В.З. Пойлов // ИВД. – 2013. – №1. – С.53
131. Хаснулин, В.И. Здоровье человека и космогеофизические факторы Севера / В.И. Хаснулин // Экология человека. – 2013. – №12. – С.3-13
132. Ходжава, М.В. Технологические аспекты влагоактивизированного гранулирования / М.В. Ходжава, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, В.А. Кеменова // Фармация. – 2013. – №1. – С.34-36
133. Хоменко В.Г. Мелатонин — как продукт шишковидной железы в регуляции физиологических функций организма / В.Г. Хоменко // Здоровье и образование в

XXI веке. – 2013. – №1-4. – С.33-36

134. Хромцова, Е.Н. Разработка технологии и анализа астрагала эспарцетного травы экстракта жидкого / Е.Н. Хромцова, Н.Н. Гужва, Т.А. Шаталова, Л.А. Мичник, О.В. Мичник, М.А. Галкин // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №11-8. – С.1612-1614

135. Цыганков, В.А. Классификация и систематизация трудоспособного населения по возрастным группам / В.А. Цыганков, С.Л. Жаркова // *ОНВ*. – 2009. – №4. – С.67-70

136. Черников, А.В. Выявление цито-биохимическим методом нормализации активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови при токсическом гепатите у крыс под влиянием регулятора энергетического обмена «Янтарь-антитокс» / А.В. Черников, В.А. Хазанов, Д.И. Кузьменко, В.Ю. Серебров // *ВНМТ*. – 2012. – №4. – С.12-16

137. Чехани, Н.Р. Разработка состава и технологии получения комплексного актопротекторного средства на основе растительного сырья / Н.Р. Чехани, Л.А. Павлова, В.М. Павлов // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2014. – №4. – С.36-45.

138. Чибисов, С.М. Телеметрическое мониторирование в патофизиологии сердца и хронокардиологии / С.М. Чибисов, М.Л. Благоднравов, В.А. Фролов. М.: РУДН, 2008.– 156 с.

139. Шаповаленко, Н.С. Влияние реамберина и элеутерококка на холодовую адаптацию организма животных / Н.С. Шаповаленко, В.А. Доровских, Н.В. Коршунова, М.А. Штарберг, С.С. Сластин // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2011. – №1. – С.80-83

140. Шаталова, Т.А. Разработка ресурсосберегающей технологии и норм качества экстракта левзеи жидкого : автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Пятигорск, 1996. – 23 с.

141. Шерманова, К.А. Влияние фитоадаптогенов растительного происхождения на организм животных / К.А. Шерманова // *Сборник научных трудов ГНУ СНИИЖК*. – 2014. – №7. – С.434-436

142. Шумко, Н.Н. Коррекция экзогенным мелатонином нарушений функций почек, вызванных иммобилизационным стрессом / Н.Н. Шумко // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – №1-4. – С.222-224
143. Эрлих, В.В. Спортсмен и его сезонные биоритмы в местах постоянного проживания в условиях мегаполиса Южного Урала / В.В. Эрлих // Человек. Спорт. Медицина. – 2013. – №1. – С.52-57
144. Юрьева, И.Н. Разработка состава и технологии капсул лекарственного препарата, содержащего кальций / И.Н. Юрьева, Г.П. Вдовина, И.П. Корюкина // Пермский медицинский журнал. – 2016. – №1. – С.71-78
145. AASM | American Academy of Sleep Medicine. The international classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual, 2nd ed. // Westchester: American Academy of Sleep Medicine, 2005. – 293 p.
146. American Herbal Pharmacopoeia, *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. – 2011. – P.374-378
147. Antonenko, Y.N. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments / Y.N. Antonenko, V.A. Roginsky, A.A. Pashkovskaya // J Membr Biol. – 2008. – V.222. – P.141-149
148. Arellanes-Licea, E. The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes / E. Arellanes-Licea, I. Caldelas, D. De Ita-Pérez, M. Díaz-Muñoz // Aging and Disease. – 2014. – Vol.5. – P.406-418
149. Arendt, J. Approaches to the Pharmacological Management of Jet Lag / J. Arendt // Drugs. – 2018. – Vol.78. – P.1419-1431
150. Bastos, D.H.M. The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) Beverages / D.H.M. Bastos, A.C. Fornari, Y.S. Queiroz, R.A.M. Soares, E.A.F.S. Torres // Acta Farm. Bonaerense. – 2005. – Vol.24. – P.91-95
151. Becker, T. A new German Charité Jet Lag Scale for jet lag symptoms and application / T. Becker, T. Penzel, I. Fietze // Ergonomics. – 2015. – Vol.58. – P.811-821
152. Bellone, G.J. Comparative analysis of actigraphy performance in healthy young subjects / G.J. Bellone, S.A. Plano, D.P. Cardinali, D.P. Chada, D.E. Vigo, D.A.

Golombek // Sleep Science. – 2016. – Vol.9. – P.272-279

153. Ben-Hamo, M. Circadian Forced Desynchrony of the Master Clock Leads to Phenotypic Manifestation of Depression in Rats / M. Ben-Hamo, T.A. Larson, L.S. Duge, C. Sikkema, C.W. Wilkinson, H.O. de la Iglesia, M.M.C. González // eNeuro. – 2016. Vol.3. – P.0237-0278

154. Berté, K.A.S. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying / K.A.S. Berté, M.R. Beux, P.K. Spada, M. Salvador, R. Hoffmann-Ribani // J Agric Food Chem. – 2011. – Vol.59. – P.5523-5527

155. Blum-Silva, C.H. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS / C.H. Blum-Silva, A.B. Luz, M.V. Nascimento, B.M. de Campos Facchin, B. Baratto, T.S. Fröde, L.P. Sandjo, E.M. Dalmarco, F.H. Reginatto // Data in Brief. – 2016. – Vol.8. – P.295-299

156. Bojić, M., Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.) / M. Bojić, V.S. Haas, D. Šarić, Ž. Maleš // Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2013. – Vol.2013. P.1-6

157. British Herbal Pharmacopoeia. – Exeter: British Herbal Medicine Association. – 1996. –212p.

158. British Pharmacopoeia. – London: H.M. Stationary Office. – 2013. – 4261 p.

159. Cerciello, A. Prednisolone Delivery Platforms: Capsules and Beads Combination for a Right Timing Therapy / A. Cerciello, G. Auriemma, S. Morello, R.P. Aquino, P. Del Gaudio, P. Russo // PLoS One. – 2016. – Vol.11 P.1-14

160. Chen, C-Q. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut / C-Q. Chen, J. Fichna, M. Bashashati, Y-Y. Li, M. Storr // World Journal of Gastroenterology. – 2011. – Vol.17. – P.3888-3898

161. Colpo, A.C. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals / A.C. Colpo, H. Rosa, M.E. Lima, C.E. Pazzini, V.B. de Camargo, F.E. Bassante, R. Puntel, D.S. Ávila, A. Mendez, V. Folmer // Food Chem. –

2016. – Vol.209.– P.185-195

162. Coomans, C.P. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock / C.P. Coomans, A. Ramkisoensing, J.H. Meijer // *Front Neuroendocrinol.* – 2015. – Vol.37. – P.29-42

163. Costello, R.B. The effectiveness of melatonin for promoting healthy sleep: a rapid evidence assessment of the literature / R.B. Costello, C.V. Lentino, C.C. Boyd, M.L. O'Connell, C.C. Crawford, M.L. Sprengel, P.A. Deuster // *Nutrition journal.* – 2014. – Vol.13.– P.106-122

164. Cuesta, M. Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells / M. Cuesta, N. Cermakian, D.B. Boivin // *The FASEB journal.* – 2015. – Vol.29.– P.1360-1370

165. Dawidowicz, A.L. PLE in the analysis of plant compounds. Part II: One-cycle PLE in determining total amount of analyte in plant material / A.L. Dawidowicz, D. Wianowska // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – Vol.37. – P.1161-1165

166. Deladino, L. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis* / L. Deladino, P.S. Anbinder, A.S. Navarro, M.N. Martino // *Carbohydrate Polymers.* – 2008. – Vol.71. – P.126-134

167. Deutsche Arzneimittel Codex (DAC), M-065 Mateblätter, geröstete. – 2015. –P.1-4

168. Deutsche Arzneimittel Codex(DAC), M-066 Mateblätter, grüne. – 2015. –P.1-4

169. Dey, A. Low dose effects of a *Withania somnifera* extract on altered marble burying behavior in stressed mice / A. Dey, S.S. Chatterjee, V. Kumar // *Journal of Intercultural Ethnopharmacology.* – 2016. – Vol.5.– P.274-277

170. Di Cesare Mannelli, L. *Astragali radix*: could it be an adjuvant for oxaliplatin-induced neuropathy? / L. Di Cesare Mannelli, A. Pacini, L. Micheli, A.P. Femia, M. Maresca, M. Zanardelli, A. Vannacci, E. Gallo, A.R. Bilia, G. Caderni, F. Firenzuoli, A. Mugelli, C. Ghelardini // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol.7. –P.1-13

171. Dugo P, Cacciola F, Donato P, Jacques RA, Caramão EB, Mondello L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts / P. Dugo, F. Cacciola, P. Donato, R.A. Jacques, E.B. Caramão, L. Mondello // *J Chromatogr A.* – 2009. – Vol.1216. – P.7213-7221

172. Eastman, C.I. Circadian rhythms of European and African-Americans after a large delay of sleep as in jet lag and night work / C.I. Eastman, V.A. Tomaka, S.J. Crowley // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol.6. – P.1-11
173. Enoki, R. Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus / R. Enoki, D. Ono, S. Kuroda, S. Honma, K. Honma // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol.7. – P.1-8
174. ESCOP Monographs 2nd ed. Supplement, *Eleutherococci radix- Eleutherococcus*. – 2009. – P.110-120
175. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 8.0, *Eleutherococci radix*, monograph. – 2014. – P.1234-1236
176. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 8.0.– Strasbourg-cedex: Council of Europe. – 2013. – 3655 p.
177. Farmacopea Argentina 7th ed. Vol.III, YERBA MATE, hoja y tallo. – 2002. – P.514-515
178. Friedrich, J.C. Genetic and Phytochemical Analysis to Evaluate the Diversity and Relationships of Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Elite Genetic Resources in a Germplasm Collection. / J.C. Friedrich, A. Gonela, M.C. Gonçalves Vidigal, P.S. Vidigal Filho, J.A. Sturion, E.L. Cardozo Junior // *Chem Biodivers*. – 2017. – Vol.14. – P.1-10
179. Gambero, A. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity / A. Gambero, M.L. Ribeiro // *Nutrients*. – 2015. – Vol.7. – P.730-750
180. Gow, R.T. Methods and compositions comprising *Ilex* / R.T. Gow, G.W. Syper, J. Pierce, D. Li, X. Yan, R.M. Marentis // US patent 7279184B2 publication date 9 Oct, 2007
181. Heck, C. and De Mejia, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations / C. Heck, E. De Mejia, // *Journal of Food Science*. 2007. – Vol.72. – P.138-151
182. Hnatiuk, V. Age and sex characteristics of melatonin-positive-labeled cells of the gastric mucosa in desynchronization in rats / V. Hnatiuk, N. Kononenko, T. Kozub, V.

- Chikitkina, L. Galiy // *Georgian Med News.* – 2016. – Vol.255. – P.99-104
183. Holowaty, S.A. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Chemical and Physical Changes under Different Aging Conditions / S.A. Holowaty, V. Trela, A.E. Thea, G.P. Scipioni, M.E. Schmalko // *J Food Process Eng.* – 2016. – Vol.39. – P.19–30
184. Ishaque, S. *Rhodiola rosea* for physical and mental fatigue: a systematic review / S. Ishaque, L. Shamseer, C. Bukutu, S. Vohra // *BMC Complementary and Alternative Medicine.* – 2012. – Vol.12. – P.1-9
185. Jacques, R.A. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods / R.A. Jacques, L.S. Freitas, V.F. Peres, C. Dariva, J.V. Oliveira, E.B. Caramão // *J. Sep. Science.* – 2006. – Vol.29. – P.2780–2784
186. Jacques, R.A., Santos Freitas L., Pérez V.F., Dariva C., Oliveira A.P., Oliveira J.V., Caramão E.B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration / R.A.Jacques, L.S. Freitas, V.F.Pérez, C.Dariva, A.P.Oliveira, J.V.Oliveira, E.B.Caramão // *Ultrason Sonochem.*– 2007. –Vol.14. – P.6-12
187. José, G. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens / G. José, P. Martin, E. Porto, M. Severino de Alencar, M. Eduardo da Glória, C.B. Corrêa, S. Ingridy, R. Cabral // *Revista Argentina de Microbiología.* – 2013. – Vol.45. – P.93-98
188. Kamangar, F. High level of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Maté drinks / F. Kamangar, M.M. Schantz, C.C. Abnet, R.B. Fagundes, S.M. Dawsey // *Cancer epidem Biomarkers and Prevention.* – 2008. – Vol.17.– P.1262-1268
189. Krokmal, I. Functional anatomy and morphology of leaf *Campanula sibirica* L/ I. Krokmal // *Ecology and Noospherology.* – 2015. Vol.26. – P.54-65
190. Li, X. Pineal Photoreceptor Cells Are Required for Maintaining the Circadian Rhythms of Behavioral Visual Sensitivity in Zebrafish / X. Li, J. Montgomery, W. Cheng, J.H. Noh, D.R. Hyde, L. Li // *PLoS ONE.* – 2012. – Vo.7. – P.1-12
191. Lieberman, H.R. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training / H.R. Lieberman, W.J. Tharion, B. Shukitt-Hale, K.L. Speckman, R. Tulley // *Psychopharmacology.* – 2002. –

Vol.164. – P.250-261

192. Lima, M.E. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans* / M.E. Lima, A.C. Colpo, W.G. Salgueiro, G.E. Sardinha, D.S. Ávila, V. Folmer // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2014. – Vol.11. P.10091-10104
193. Madsen, M.T. The effect of Melatonin on Depressive symptoms, Anxiety, Circadian and Sleep disturbances in patients after acute coronary syndrome (MEDACIS): study protocol for a randomized controlled trial / M.T. Madsen, A. Isbrand, U.O. Andersen // *Trials*. – 2017. – Vol.18. – P.1-11
194. Matsumoto, R.T. Effects of Maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women / R.T. Matsumoto, D.M. Bastos // *J Agric Food Chem*. – 2009. – Vol.57. – P.1775-1780
195. McCarthy, M.J. Calcium Channel Genes Associated with Bipolar Disorder Modulate Lithium's Amplification of Circadian Rhythms / M.J. McCarthy, M. LeRoux, H. Wei, S. Beesley, J.R. Kelsoe, D.K. Welsh // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol.101. – P.439-448
196. Mendes, F.R. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil / F.R. Mendes, E.A. Carlini // *J Ethnopharmacol*. – 2007. – Vol.109. – P.493-500
197. Mills, S. *The Essential Guide to Herbal Safety, Siberian Ginseng* / S. Mills, K. Bone // St. Louis: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. – P.578-580
198. Mills, S., Bone, K., *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*, 2nd ed. / S. Mills, K. Bone // Edinburgh: Churchill Livingstone, 2013. – 1065 p.
199. Miranda, D.C. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice / D.C. Miranda, D.P. Arcart, J. Pedrazzoli, P. Carvalho, S.M. Cerutti, H.M. Bastos, M.L. Ribeiro // *Mutagenesis*. – 2008. – Vol.23. – P.261–265
200. Moiseyenko, Y.V. Antarctica challenges the new horizons in predictive,

- preventive, personalized medicine: preliminary results and attractive hypotheses for multi-disciplinary prospective studies in the Ukrainian “Akademik Vernadsky” station / Y.V. Moiseyenko, V.I. Sukhorukov, G.Y. Pyshnov, I.M. Mankovska, K.V. Rozova, O.A. Miroshnychenko, O.E. Kovalevska, S-A.Y. Madjar, R.V. Bubnov, A.O. Gorbach, K.M. Danylenko, O.I. Moiseyenko // *The EPMA Journal*. – 2016. – Vol.7. – P.1-19
201. Mysliwec, V. Sleep Disorders in US Military Personnel: A High Rate of Comorbid Insomnia and Obstructive Sleep Apnea / V. Mysliwec, J. Gill, H. Lee, T. Baxter, R. Pierce, T.L. Barr, B. Krakow, B.J. Roth // *Chest*. – 2013. – Vol.144. P.549-557
202. Naczki, M. Extraction and analysis of phenolics in food / M. Naczki, F. Shahidi // *J. Chromatogr. A*. – 2004. – Vol.1054. – P. 95-111
203. Niederquell, A. Introduction of a Theoretical Splashing Degree to Assess the Performance of Low-Viscosity Oils in Filling of Capsules / A. Niederquell, M. Kuentz // *AAPS PharmSciTech*. – 2011. – Vol.12. –P.323-330
204. Oliveira, D. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats / D. Oliveira, H.S. Freitas, M.F.F. Souza, D.P. Arçari, M.L. Ribeiro, P.O. Carvalho, D.H. Bastos // *J Agric Food Chem*. – 2008. – Vol.56. – P.10527-10532
205. Palmeri, A. Salidroside, a Bioactive Compound of *Rhodiola Rosea*, Ameliorates Memory and Emotional Behavior in Adult Mice / A. Palmeri, L. Mammana, M.R. Tropea, W. Gulisano, D. Puzzo // *J Alzheimers Dis*. – 2016. – Vol.52. – P.65-75
206. Panossian A. Plant adaptogens III.* Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action / A. Panossian, G. Wikman, H. Wagner / *Phytomedicine*. – 1999. – Vol.6. – P.287-300
207. Panossian, A. Effects of Adaptogens on the Central Nervous System and the Molecular Mechanisms Associated with Their Stress—Protective Activity / A. Panossian, G. Wikman // *Pharmaceuticals*. – 2010. – Vol.3. – P.188-224
208. Panossian, A. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity / A. Panossian, G. Wikman // *Curr Clin Pharmacol*. – 2009. – Vol.4. – P.198-219

209. Parikh D.M. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. 3rd ed. / D.M. Parikh // Research Triangle Park: CRC Press, 2009. – 676 p.
210. Patel, S. Adaptogenic herb ginseng (*Panax*) as medical food: Status quo and future prospects / S. Patel, A. Rauf // Biomed Pharmacother. – 2017. – Vol.85. – P.120-127
211. Peres, V.F. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth / V.F. Peres, J. Saffi, M.I.S. Melecchi, F.C. Abad, R. de Assis Jacques, M.M. Martinez, E.C. Oliveira, E.B. Caramão // J. Chromatogr A. – 2006. – Vol.1105. – P.115-118
212. Pharmacopée Française, XI éd., MATÉ. *Ilici paraguariensis* folium. – 2010. – P.1-3
213. Pinto, R.M.C. Detection and quantification of phytochemical markers of *Ilex paraguariensis* by liquid chromatography / R.M.C. Pinto, B.M. Lemes, A.A.F. Zielinski, T.P. Klein, K.A. Fernando, A.S.F. Marques, A.D.I.M. Nogueira, F.L. Beltrame // Química Nova. – 2015. – Vol.38. – P.1219-1225
214. Portela, J.L. *Ilex paraguariensis* crude extract acts on protection and reversion from damage induced by t-butyl hydroperoxide in human erythrocytes: a comparative study with isolated caffeic and/or chlorogenic acids / J.L. Portela, D. Soares, H. Rosa, D.H. Roos, S. Pinton, D.S. Ávila, R.L. Puntel // J Sci Food Agric. – 2017. – Vol.97. – P.2007-2014
215. Rakocevic, M. Time series in analysis of yerba-mate biennial growth modified by environment / M. Rakocevic, S.F. Martim // Int J Biometeorol. – 2011. – Vol.55. – P.161-71
216. Rathor, R. A pharmacological investigation of *Hippophae salicifolia* (HS) and *Hippophae rhamnoides turkestanica* (HRT) against multiple stress (C-H-R): an experimental study using rat model / R. Rathor, P. Sharma, G. Suryakumar, L. Ganju // Cell Stress & Chaperones. – 2015. – Vol.20. – P.821-831
217. Reis E.D.M. Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats / E.D.M. Reis, F.W.S Neto, V.B. Cattani, L.R. Peroza, A. Busanello, C.Q. Leal, A. A. Boligon, T.F. Lehmen, M. Libardoni, M.L. Athayde, R. Fachinetto // BioMed Research

International. – 2014. – Vol.2014. – P.1-9

218. Reis, C. Sleep complaints and fatigue of airline pilots / C. Reis, C. Mestre, H. Canhão, D. Gradwell, T. Paiva // *Sleep Science*. – 2016. – Vol.9. – P.73-77

219. Riede, S.J. The flexible clock: predictive and reactive homeostasis, energy balance and the circadian regulation of sleep-wake timing / S.J. Riede, V. van der Vinne, R.A. Hut // *J Exp Biol*. – 2017. Vol.220. – P.738-749

220. Roman, J. Development and evaluation of tablets from spray dried extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil A) / J. Roman, C.V. Garcia, A.S.L. Mendez, F.E.B. Silva // *Revista Cubana de Farmacia*. – 2013. – Vol.47. – P.379-388

221. Saikh, M.A. A Technical Note On Granulation Technology: A Way To Optimise Granules / M.A. Saikh // *International Journal of Pharm. Science and Research*. – 2013. – Vol.4. – P.55-67

222. Salve, B.A. Effect of *Tinospora cordifolia* on physical and cardiovascular performance induced by physical stress in healthy human volunteers / B.A. Salve, R.K. Tripathi, A.U. Petare, A.A. Raut, N.N. Rege // *Ayu*. – 2015. – Vol.36. – P.265-270

223. Santhi, N. Sex differences in the circadian regulation of sleep and waking cognition in humans / N. Santhi, A.S. Lazar, P.J. McCabe, J.C. Lo, J.A. Groeger, D-J. Dijk // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol.113.– P.2730-2739

224. Shanmugam, S. Granulation techniques and technologies: recent progresses. / S. Shanmugam // *BioImpacts*. – 2015. – Vol.5. – P.55-63

225. Shao, M.R. Stress-responsive pathways and small RNA changes distinguish variable developmental phenotypes caused by MSH1 loss / M.R. Shao, S. Kumar Kenchanmane Raju, J.D. Laurie, R. Sanchez, S.A. Mackenzie // *BMC Plant Biol*. – 2017. – Vol.17. – P.47

226. Shinde, N. Recent Advances in Granulation Techniques / N. Shinde, N. Aloorkar, A. Kulkarni, B. Bangar, S. Sulake, P. Kumbhar // *Asian J. Res. Pharm. Sci*. – 2014. – Vol.4. – P.38-47

227. Skeldon, A.C. The effects of self-selected light-dark cycles and social constraints on human sleep and circadian timing: a modeling approach / A.C. Skeldon, A.J.K.

- Phillips, D-J. Dijk // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol.7. – P.451-458
228. Song, A. How jet lag impairs Major League Baseball performance / A. Song, T. Severini, R. Allada // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol.114. – P.1407-1141
229. Souza, L.M. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry / L.M. Souza, N. Dartora, C.T. Scoparo, T.R. Cipriani, P.A. Gorin, M. Iacomini, G.L. Sasaki // *J Chromatogr A*. – 2011. – Vol.1218. – P.7307-7315
230. Sultan, A. Worsening of rest-activity circadian rhythm and quality of life in female breast cancer patients along progression of chemotherapy cycles / A. Sultan, V. Choudhary, A. Parganiha // *Chronobiol Int*. – 2017. – Vol.16. – P.1-15
231. Suryawanshi, A.P. Granulation Techniques / A.P. Suryawanshi, D.M. Shinkar, R.B. Saudagar // *Asian J. Res. Pharm. Sci*. – 2015. – Vol.5. – P.203-215
232. Takasaki, H. Importance of excipient wettability on tablet characteristics prepared by moisture activated dry granulation (MADG) / H. Takasaki, E. Yonemochi, R. Messerschmid, M. Ito, K. Wada, K. Terada // *Int J Pharm*. – 2013. – Vol.456. – P.58-64
233. The Japanese Pharmacopoeia, 17th. ed. – Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. – 2016. – 2630 p.
234. The United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 39-NF 34). Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc.– 2016. – 7608 p.
235. Thejaswini, P. Advanced granulation techniques for pharmaceutical formulations overview / P. Thejaswini, B. Suguna, N. Sumalatha, K. Umasankar, P. Jayachandra // *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. – 2013. – Vol.2. – P.723-732
236. Touitou, Y. À propos du système circadien chez l'homme : de l'horloge interne à la sécrétion de mélatonine / Y. Touitou // *Ann Pharm Fr*. – 2016. – Vol.74. – P.331-334
237. Ullah, I. Moisture-Activated Dry Granulation / I. Ullah // *Pharm. Technol. Europe*. – 2011. – Vol.22. – P.4-5
238. Venkateswara, Reddy B. Process development and optimization for moisture activated dry granulation method for losartan potassium tablets / B. Venkateswara

- Reddy, K. Navaneetha, K. Venkata Ramana Reddy // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol.6. – P.312-317
239. Waksmundzka-Hajnos, M. High-Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Chromatographic science series / M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma // Boca Raton: CRC Press. – 2011. – 996 p.
240. WHO | World Health Organization: [<http://www.who.int/en/>]. URL: http://www.who.int/ith/mode_of_travel/jet_lag/en/ (дата обращения: 16.02.2016)
241. WHO monographs on selected medicinal plants, Vol. 2, Radix Eleutherococci // Geneva: World Health Organization. – 2002. – P.83-96
242. Wiczorek, J. Changes in melatonin secretion in tourists after rapid movement to another lighting zone without transition of time zone / J. Wiczorek, K. Blazejczyk, T. Morita // Chronobiol Int. – 2016. – Vol.33. – P.220-233
243. Wnuk, M. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro / M. Wnuk, A. Lewinska, B. Oklejewicz, M. Bugno, E. Slota, G. Bartosz // Mutat Res. – 2009. – Vol.679. – P.18-23
244. Yan, S-S. The effect of lens aging and cataract surgery on circadian rhythm / S-S. Yan, W. Wang // International Journal of Ophthalmology. – 2016. – Vol.9. – P.1066-1074
245. Yatsu, F.K.J. *Ilex paraguariensis* Pellets from a Spray-Dried Extract: Development, Characterization, and Stability / F.K.J. Yatsu, G.S. Borghetti, F. Magalhães, H.G. Ferraz, E.P. Schenkel, Bassani // AAPS PharmSciTech. – 2016. – Vol.17. – P.358-367
246. Yin, X. A comparison study on extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology / X. Yin, Q. You, X. Su // Carbohydr Polym. – 2014. – Vol.102. – P.419-422
247. Yonny, M.E. Thermal Stress in Melon Plants: Phytoprostanes and Phytofurans as Oxidative Stress Biomarkers and the Effect of Antioxidant Supplementation / M.E. Yonny, A.R. Torresi, C. Cuyamendous, G. Réversat, C. Oger, J.M. Galano, T. Durand, C. Vigor, M.A. Nazareno // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2016. – Vol.64. – P.8296-8304

248. Zhang, Q. An economical and efficient technology for the extraction of resveratrol from peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by multi-stage countercurrent extraction / Q. Zhang, Y. Bian, Y. Shi, S. Zheng, X. Gu, D. Zhang, X. Zhu, X. Wang, D. Jiang, Q. Xiong // *Food Chem.* – 2015. – Vol.179. – P.15-25
249. Zulley, J. Biological rhythm, sleep and jet lag / J. Zulley // *Ther Umsch.* –2014. – Vol.71. – P.631-635

Приложение А. Патент РФ № 2577701 от 20.03.2016 «Средство, обладающее хронокорректирующей и адаптогенной активностью»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2577701

**СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ
ХРОНОКОРРЕКТИРУЮЩЕЙ И АДАПТОГЕННОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015109202

Приоритет изобретения 17 марта 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 16 февраля 2016 г.

Срок действия патента истекает 17 марта 2035 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



Приложение Б. Результаты доклинического изучения эффективности ЛФ СКЭП

В ходе исследований была изучена ЛФ СКЭП, в сравнении с препаратом Мелаксен[®]. Были также изучены действующие вещества исследуемых ЛФ по отдельности и в комбинациях.

Животные были разделены на 10 групп по 16 (крысы самцы) и 20 (мыши самцы) для изучения СКЭП. Расчет доз исследуемых веществ эквивалентных для животных проводился согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян. – М. : Гриф и К, - 2012 (таблица Б.1).

Таблица Б.1 - Изучаемые дозы веществ при исследовании эффективности ЛФ СКЭП при моделировании светового десинхроноза

Исследуемое вещество	ТД _{сутки}	ЭТД _{мыши}	ЭТД _{крысы}
Мелаксен [®]	0,04 мг/кг	0,52 мг/кг	0,24 мг/кг
ЛФ СКЭП	16,57 мг/кг	215,41 мг/кг	99,42 мг/кг
экстракт элеутерококка сухой	2,86 мг/кг	37,18 мг/кг	17,16 мг/кг
экстракт падуба сухой	7,14 мг/кг	92,82 мг/кг	42,84 мг/кг
янтарная кислота	2,86 мг/кг	37,18 мг/кг	17,16 мг/кг
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падуба сухой	10 мг/кг	130 мг/кг	60 мг/кг
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	4,26 мг/кг	55,38 мг/кг	25,56 мг/кг
экстракт падуба сухой+янтарная кислота	8,57 мг/кг	111,41 мг/кг	51,42 мг/кг

Для исследования ЛФ СКЭП, экспериментальным группам животных вводили исследуемые растворы в дозе 1ЭТД: 1 – интакт, получали внутривентрикулярно 1% раствор крахмала; 2 – контроль, получали внутривентрикулярно 1% раствор крахмала; 3 – получали внутривентрикулярно в виде суспензии Мелаксен[®]; 4 – получали гранулят смеси экстрактов падуба парагвайского и элеутерококка колючего, и субстанции-порошка янтарной кислоты; 5 – получали внутривентрикулярно экстракт элеутерококка сухой; 6 – получали внутривентрикулярно экстракт падуба сухой; 7 – получали внутривентрикулярно янтарную кислоту; 8 – получали внутривентрикулярно смесь экстрактов элеутерококка сухого и падуба сухой; 9 – получали внутривентрикулярно экстракт элеутерококка сухого и янтарную кислоту; 10 – получали внутривентрикулярно экстракт падуба сухой и янтарную кислоту. Все группы, за исключением интакта подвергались воздействию

десинхроноза.

По истечении трех недель от начала эксперимента животных подвергали эвтаназии методом декапитации. Животных предварительно вводили в глубокий наркоз диэтиловым эфиром в соответствии с ГОСТ Р 33044-2014 от 1 августа 2015 года «Принципы надлежащей лабораторной практики» и приказом МЗ РФ №199н от 1 апреля 2016 года. Данный вид эвтаназии является гуманным и не противоречит нормативным документам, сопровождается минимумом боли, страданий и дистресса.

Результаты исследования эффективности СКЭП

Данные, полученные при исследовании различных комбинаций СКЭП в сравнении с препаратом Мелаксен® при смоделированном световом десинхронозе, представлены в таблицах Б.2-7.

Таблица Б.2 - Влияние ЛФ СКЭП на динамику изменения времени плавания самцов крыс ($M \pm m$, с) при смоделированном световом десинхронозе

Группы	Плавание		
	1 день	7 день	21 день
Интакт	226,8±18	274,7±11,6 ^{*,**}	381,5±16,3 ^{*,**}
Контроль	235,6±13	245,7±17,8	198,2±12,1 ^{*,**}
Мелаксен®	230,7±15,4	272,1±12 ^{*,**}	258±8,1 ^{*,**}
ЛФ СКЭП	230,3±18,1	356±8,8 ^{*,**}	439,1±17 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой	226,8±17,7	296,8±19,1 ^{*,**}	344,6±13,7 ^{*,**}
экстракт падула сухой	236,7±19,9	349,3±19	397,9±18,2 ^{*,**}
янтарная кислота	228,3±19,7	274±11,2 ^{*,**}	349,1±12 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падула сухой	212,2±21,3	322,4±18 ^{*,**}	372±12,2 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	233,9±19,1	276±14,9 ^{*,**}	331,2±20,6 ^{*,**}
экстракт падула сухой+янтарная кислота	225±17,6	340,3±20,3	366±17,6 ^{*,**}

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

** -достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Таблица Б.3 - Влияние ЛФ СКЭП на динамику изменения времени плавания самцов мышей ($M \pm m$, с) при смоделированном световом десинхронозе

Группы	Плавание		
	1 день	7 день	21 день
Интакт	423,1±13,4	467,4±19,8	564,1±19,7 ^{*,**}
Контроль	424,2±13	363,1±13,5 ^{*,**}	312,1±19,2 ^{*,**}
Мелаксен®	420,7±16	432±16,2	374,5±17,6 ^{*,**}
ЛФ СКЭП	420,2±15,4	565,1±16,1 ^{*,**}	627±17,5 ^{*,**}

Продолжение таблицы Б.3

экстракт элеутерококка сухой	422±17,6	477±19,2 ^{*,**}	520,8±15,5 ^{*,**}
экстракт паду́ба сухой	416,7±13	522,7±21,3 ^{*,**}	597,3±15,3 ^{*,**}
янтарная кислота	429±15,2	502±16,1 ^{*,**}	508,2±16,2 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт паду́ба сухой	412,5±16,4	531,1±19,2 ^{*,**}	602,5±15,3 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	422,5±17,2	499,5±15,5 ^{*,**}	510,6±18,2 ^{*,**}
экстракт паду́ба сухой+янтарная кислота	416,2±18,8	512,3±15 ^{*,**}	582,4±16,2 ^{*,**}

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

**-достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Таблица Б.4 - Влияние ЛФ СКЭП на показатели ориентировочно-исследовательского поведения самцов крыс в тесте «открытое поле» ($M \pm m$) при смоделированном световом десинхронозе

Группы	1 день				
	ГДА	ВДА	Груминг, с	Норки	Болюсы
Интакт	66,3±10,9	13,5±1,6	16±1,2	9,3±1	5±0,8
Контроль	73,3±8,4	13,6±1	15,1±1,8	10,6±0,7	4±0,8
Мелаксен [®]	68±8,6	12,7±1,9	16,1±1,1	8,2±0,6	4,1±0,9
ЛФ СКЭП	58,8±10,2	14,2±0,9	15,8±0,8	9,2±0,7	4,4±0,7
экстракт элеутерококка сухой	56,7±10,7	13,1±1,1	15,3±1,1	8,1±0,9	5,1±0,5
экстракт паду́ба сухой	59,6±8,3	12,6±0,8	15,7±1	9±0,6	5,5±0,7
янтарная кислота	64,3±9,2	14,4±1,1	14,5±0,8	8,2±0,4	4,6±0,5
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт паду́ба сухой	59,6±8,8	12,7±0,7	16,6±1	8,9±0,4	5,3±0,6
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	64,5±8,3	14,5±0,8	17,4±1,1	9,9±0,8	5,1±0,5
экстракт паду́ба сухой+янтарная кислота	67,5±9,9	13,3±0,9	15,3±0,9	8±0,6	4,4±0,5
7 день					
Интакт	55±6,3	11,2±1,1 ^{*,**}	19,2±3,2	8,8±1,8	3,8±0,3 [*]
Контроль	36,3±7,8 [*]	5,5±1,9 [*]	22±1,7 ^{*,**}	8,5±1,5	2,8±2 [*]
Мелаксен [®]	40,6±10,5 ^{*,**}	12,1±0,5	14,8±2,3	7±0,8 ^{*,**}	4,1±0,2
ЛФ СКЭП	60,1±9,9	12,6±0,8	8,4±1 ^{*,**}	9,2±0,8	4,3±0,7
экстракт элеутерококка сухой	55,6±10,9	11,8±0,8	13,6±1,5	8±0,9	3,1±0,6 ^{*,**}
экстракт паду́ба сухой	50,6±8,4 ^{*,**}	8,1±1 ^{*,**}	13,5±0,9 ^{**}	8,9±1,1	2,5±1,1 ^{*,**}
янтарная кислота	49,5±9,9 ^{**}	10,1±0,7 ^{*,**}	14±1,1	8±0,9	2,9±0,9 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт паду́ба сухой	58,2±10,8	13,3±1	15,9±0,7	9,2±0,7	4,1±0,9
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	60±8,7	13,8±0,8	15,5±1	10,1±0,9	5±1,1
экстракт паду́ба сухой+янтарная кислота	55±8,2 ^{**}	9,6±1,1 ^{*,**}	16,2±0,8	12,6±0,8 ^{*,**}	2,7±0,8 ^{*,**}

Продолжение таблицы Б.4

21 день					
Интакт	50,6±11,3	12,1±1,6	17,5±1,6	10,6±0,5	3±1,8
Контроль	20,5±8 ^{*,**}	3,2±1,8 ^{*,**}	19,3±1,8 ^{*,**}	4,2±0,7 ^{*,**}	7,8±0,8 ^{*,**}
Мелаксен [®]	27,1±9,9 ^{*,**}	9,7±1,4 ^{*,**}	13,1±1,9	8,9±0,9	3,5±1,6 ^{**}
ЛФ СКЭП	70,3±8,9	22,9±1 ^{*,**}	5,5±1,2 ^{*,**}	9,6±0,7	4,4 ±0,7
экстракт элеутерококка сухой	53,5±8,9	12,6±1,1	14±1,2 ^{*,**}	9±0,9	4,1±0,9
экстракт падуба сухой	40,5±9,1 ^{*,**}	9,1±0,8 ^{*,**}	16,4±1,1 [*]	3,3±0,9 ^{*,**}	2,3±0,9 ^{**}
янтарная кислота	43,3±7,4 ^{*,**}	10,2±1,1 ^{*,**}	13,7±1,2	6,1±0,7 ^{*,**}	2,3±0,9 ^{**}
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падуба сухой	57,9±9,1	12,9±1	13,6±1,1	8,5±0,6	3,3±0,8 [*]
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	59,5±8,7	12,3±1,1	13,7±1,1	10,1±1	4,1±0,7 ^{**}
экстракт падуба сухой+янтарная кислота	42,2±8 ^{*,**}	6,3±0,9 ^{*,**}	20,2±1 ^{*,**}	8,4±1,1 ^{*,**}	2,2±0,7 ^{*,**}

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

** -достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Таблица Б.5 - Влияние ЛФ СКЭП на АОА крови самцов крыс при смоделированном световом десинхронозе

Группа	Среднее значение концентрации тролокса, (мкмоль/л)
Интакт	175,5±7,6 ^{**}
Контроль	224,5±4,8 [*]
Мелаксен [®]	231,7±4,3 [*]
ЛФ СКЭП	357,4±12,7 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой	272,6±10,3 ^{*,**}
экстракт падуба сухой	241,8±15,3 ^{**}
янтарная кислота	252,9±9,7 ^{**}
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падуба сухой	299,2±11,6 ^{*,**}
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	302,8±10,8 ^{*,**}
экстракт падуба сухой+янтарная кислота	287,1±12,5 ^{*,**}

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

** -достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Таблица Б.6 - Влияние ЛФ СКЭП на изменения массы органов тела самцов крыс ($M \pm m$) при смоделированном световом десинхронозе

Группа	Масса органов			
	Печень, %	Селезенка, %	Тимус, %	Надпочечники, %
Интакт	3,8±0,1**	0,33±0,04**	0,16±0,01**	0,016±0,001**
Контроль	3,1±0,1*	0,26±0,02*	0,09±0,03*	0,011±0,001*
Мелаксен®	3,2±0,1	0,3±0,04**	0,14±0,03	0,012±0,002
ЛФ СКЭП	3,4±0,1*	0,34±0,02**	0,15±0,01**	0,015±0,001**
экстракт элеутерококка сухой	3,4±0,1*	0,33±0,02**	0,13±0,02	0,014±0,001**
экстракт падуба сухой	3,3±0,1	0,29±0,03*	0,12±0,02	0,013±0,002
янтарная кислота	3,2±0,1*	0,3±0,03*	0,12±0,01*	0,012±0,002
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падуба сухой	3,5±0,1**	0,31±0,02*	0,13±0,02	0,014±0,002
экстракт падуба сухой+янтарная кислота	3,4±0,1*	0,3±0,02*	0,14±0,02	0,013±0,002

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

** -достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Таблица Б.7 - Влияние ЛФ СКЭП на изменения массы органов тела самцов мышей ($M \pm m$) при смоделированном световом десинхронозе

Группа	Масса органов			
	Печень, %	Селезенка, %	Тимус, %	Надпочечники, %
Интакт	5,8±0,3**	0,88±0,31**	0,18±0,07**	0,021±0,004**
Контроль	4,5±0,8*	0,4±0,2*	0,09±0,04*	0,009±0,005*
Мелаксен®	4,8±0,5*	0,69±0,39	0,13±0,05	0,011±0,005*
ЛФ СКЭП	4,8±0,2*	0,7±0,18**	0,19±0,03**	0,02±0,003**
экстракт элеутерококка сухой	4,8±0,3*	0,68±0,17**	0,17±0,04	0,018±0,004
экстракт падуба сухой	4,7±0,3*	0,51±0,19	0,15±0,04	0,012±0,004**
янтарная кислота	4,9±0,2*	0,45±0,13	0,15±0,03	0,015±0,003
экстракт элеутерококка сухой+ экстракт падуба сухой	4,9±0,2*	0,6±0,17	0,18±0,04	0,019±0,003
экстракт элеутерококка сухой+янтарная кислота	5,2±0,2*	0,61±0,17	0,17±0,03	0,021±0,004**
экстракт падуба сухой+янтарная кислота	4,8±0,3*	0,39±0,2	0,16±0,04	0,015±0,003

*-достоверное отличие от группы интакт при $P \geq 0,95$;

** -достоверное отличие от группы контроль при $P \geq 0,95$

Эксперименты показали, что во всех контрольных группах животных наблюдался мощный десинхронизирующий эффект, который выразался в снижении исследовательской активности, времени плавания животных, негативном влиянии (истощении) стресс-компетентных органов (печень,

селезенка, тимус, надпочечники) и снижении содержания антиоксидантов в сыворотке крови крыс.

В группе животных получавших препарат сравнения Мелаксен® увеличивалась исследовательская активность и оказывалось положительное воздействие на стресс-компетентные органы, но продолжительность плавания и АОА не увеличивались. В отличие от контрольных групп, у животных, получавших ЛФ СКЭП, увеличивалась исследовательская активность, продолжительность плавания, оказывалось положительное воздействие на стресс-компетентные органы, а также наблюдалась самая высокая АОА в сыворотке крови крыс при смоделированном двухнедельном десинхронозе. Актопротекторное действие можно было увидеть через увеличение продолжительности плавания. Таким образом, можно было вести речь о повышении неспецифической переносимости животными чрезмерной физнагрузки.

В соответствии с информацией, которую можно увидеть в таблицах Б.2 и Б.3, введение ЛФ СКЭП, осуществляемое на протяжении трех недель, приводило к тому, что у животных почти в полной мере сохранялись физиологические функции, если сравнивать с интактными животными. Так, у крыс и мышей время плавания увеличивалось на 32 и 23% соответственно. Это было значительным отличием от животных из интактной группы. Длительность плавания животных, которые входили в группу СКЭП, увеличивалась на 110 и 68% у крыс и мышей, если сравнивать с группой, набранной для контроля ($p \leq 0,05$). Препаратом сравнения являлся Мелаксен®. Его использование приводило к тому, что длительность плавания увеличивалась на 30 и 16% у крыс и мышей, если сравнивать с контрольной группой. Когда же сравнение осуществлялось между показателями, наблюдаемыми у интактных животных и у контрольных животных, можно было увидеть уменьшение последних на 56 и 44%. Можно сделать вывод о том, что в такой степени, в какой имеют место компенсаторные реакции, как в опытной группе, у животных, которым давался Мелаксен®, не происходили.

Анализ характеристик теста «Открытое поле» показал (таблица Б.4), что

введение введение ЛФ СКЭП достоверно увеличивало показатель ГДА по отношению к группам интакт, контроль и Мелаксен® на 26, 77 и 75% соответственно; показатель ВДА по отношению к группам интакт, контроль и Мелаксен® на 73, 118 и 117% соответственно. Увеличение количества ГДА и ВДА, у группы животных которым вводились ЛФ СКЭП интерпретируется как снижение тревожности животных в условиях стресса. Увеличение количества болюсов в группе контроля сигнализирует о возрастающей эмоциональности животных.

Данные полученные в ходе исследования АОА, свидетельствуют о самой высокой АОА в сыворотке крови крыс в группе, получавших ЛФ СКЭП ($357,4 \pm 12,7$ мкмоль/л). В образцах сыворотки крови крыс других групп так же наблюдалась тенденция к повышению уровня АОА в сравнении с группой интакт (таблица Б.5).

Результаты взвешивания стресс-компетентных органов (таблицы Б.6-7) подтверждают положительное влияние ЛФ СКЭП на механизмы адаптации при смоделированном десинхронозе. На модели светового десинхроноза СКЭП при повторном введении, показал достоверный антидесинхронизирующий эффект, уменьшив истощение 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.

Заключение

1. Десинхронизирующий эффект наблюдался в контрольной группе животных. Его можно было увидеть через уменьшение активности исследований, продолжительности плавания животных. Также имело место отрицательное воздействие на печень, надпочечники, тимус, селезенку.

2. Отрицательные эффекты, которые сопровождают десинхроноз, могут быть уменьшены посредством различных комбинацией ЛФ, подлежащей исследованию. Суточная доза активных веществ может привести к появлению хронокорректирующего эффекта, при котором будут отсутствовать отрицательные

для организма последствия.

3. В соответствии с данными, полученными в рамках экспериментов, можно сказать, что у ЛФ СКЭП наблюдается хронокорректирующее влияние при наличии светового десинхроноза. Помимо этого, у них наблюдается интенсивная адаптогенная активность.

Приложение В. Акт о внедрении

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Приволжский
исследовательский медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России)


И.А. Клеменова
« ___ » _____ 2019 г.

АКТ

« ___ » _____ 2019 г.
г. Нижний Новгород

о внедрении результатов диссертационного исследования *Бобок Максима Николаевича* на тему «Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для коррекции десинхроноза» в учебный процесс кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова

Материалы диссертационной работы Бобок М.Н. внедрены в учебный процесс кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова и используются при подготовке врачей по специальностям: «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело» по программе дисциплины «Нормальная физиология» при проведении лекционных и лабораторных занятий в разделе «Регуляция физиологических функций организма», а также аспирантов, обучающихся по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки», направленности «Физиология» по программам дисциплины «Физиология», «Экспериментальное моделирование».

Материалы диссертационного исследования Бобок М.Н. используются также при выполнении научно-исследовательской работы сотрудников кафедры и студентов по теме «Влияние светового десинхроноза на функциональное состояние организма».

Заведующий кафедрой нормальной
физиологии им. Н.Ю. Беленкова,
д.б.н., профессор



И.В. Мухина

Приложение Г. Акт о внедрении

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова Минздрава России
 (Сеченовский Университет)



Литвинова Т.М.

20__ г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Бобок Максима Николаевича в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бобок Максима Николаевича на тему «Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для коррекции десинхроноза» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплины фармацевтическая технология, читаемая студентам по специальности 33.05.01 «Фармация».

Директор Института
 фармации им. А.П. Нелюбина
 д.ф.н., профессор

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
 фармацевтической технологии
 Института фармации им. А.П. Нелюбина

Краснюк И.И.

Начальник Учебного управления
 к.м.н.

Юдина Л.Ю.

Приложение Д. Акт о внедрении

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

_____ Литвинова Т.М.

« _____ » _____ 20__ г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Бобок Максима Николаевича в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бобок Максима Николаевича на тему «Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для коррекции десинхроноза» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплины фармакогнозия, читаемая студентам по специальности 33.05.01 «Фармация».

Директор Института
фармации им. А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор



Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой фармацевтического
естествознания
Института фармации им. А.П. Нелюбина



Луферов А.Н.

Начальник Учебного управления
к.м.н.



Юдина Л.Ю.

Приложение Е. Акт о внедрении

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Литвинова Т.М.

« _____ » 20__ г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Бобок Максима Николаевича в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бобок Максима Николаевича на тему «Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для коррекции десинхроноза» внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплины фармакология, читаемая студентам по специальности 33.05.01 «Фармация».

Директор Института
фармации им. А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой фармакологии
Института фармации им. А.П. Нелюбина

Смолярчук Е.А.

Начальник Учебного управления
к.м.н.

Юдина Л.Ю.

Приложение Ж. Акт о внедрении

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Литвинова Т.М.

« » 20 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Бобок Максима Николаевича в учебный процесс кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бобок Максима Николаевича на тему «Разработка и исследование комплексного лекарственного препарата для коррекции десинхроноза» внедрены в учебный процесс кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплины аналитическая химия, читаемая студентам по специальности 33.05.01 «Фармация».

Директор Института
фармации им. А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой аналитической,
физической и коллоидной химии
Института фармации им. А.П. Нелюбина

Краснюк И.И. (мл).

Начальник Учебного управления
к.м.н.

Юдина Л.Ю.

Приложение И. Паспорт качества на лекарственное сырьё



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas,
Regulación e Institutos
A.N.M.A.T.
Instituto Nacional de Alimentos
Delegación Posadas

Receptor No. _____
 Posadas _____

Po-08278



POSADAS

Expte. N°/T.I.N °: 00007-Q/2.016.- **Número de Entrada: 122/2.016.-**
Muestra manifestada: YERBA MATE ELABORADA SIN PALO
Motivo: ANÁLISIS DE CONTROL
Recibida en esta repartición con Nota de Fecha 16 de Mayo de 2.016.-
De: LIC. SANTIAGO QUIÑONES P/ MAVEA S.A.-

Su Análisis ha dado el siguiente Resultado:

DESCRIPCION DE LA MUESTRA: envase original, conteniendo un producto vegetal desecado, finamente triturado, de color verde con aroma y sabor característico.
 Fecha de Vencimiento: Consumir preferentemente antes del 30/04/2019
 R.N.E. N° 14000116 R.N.P.A. N° 14000286

DETERMINACIONES EFECTUADAS:

EXAMEN FISICOQUIMICO:

Marca del producto	: DON LUCAS
Estado de conservación	: Bueno
Caracteres organolépticos	: Satisfactorios
Humedad (100-105°C)	: 5.9
Cenizas Totales (500-550°C) sps	: 6.67
Cenizas insolubles en CIH al 10%	: 1.5
Extracto acuoso AOAC	: 32.19
Cafeína (Método de Cortés) sps	: 1.17
Peso neto/real	: 500

TAMIZADO:

Total de palos	g% : 4.16
Total de hojas	g% : 95.84

GENUINIDAD:

Sustancias vegetales extrañas	g% : < 1
Semillas de yerba mate	g% : < 1

No. 10. Control

ANÁLISIS PARA PARTICIPACIÓN SIN INTERVENCIÓN OFICIAL LEY 11245 T. O. 1952 D. R. Art. 9. ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL

Armando Pors Carrete

Armando Pors Carrete

EXAMEN MICROBIOLÓGICO:

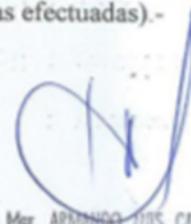
Recuento total de Bacterias aerobias mesófilas en agar Plate-count, 24-48 hs, 35-37°C	UFC/g : 1×10^4
Coliformes totales	UFC/g : Menor de 50
Coliformes fecales en 1 gramo	: Ausencia
Recuento total de Mohos y Levaduras en Agar YGC, 3-5 días, 20-25°C	UFC/g : Mayor de 10^4

SUGERENCIA: De acuerdo a los Resultados obtenidos en el Examen Microbiológico **SE SUGIERE** verificar la calidad de la materia prima y las Buenas Prácticas de Elaboración.-

NOTA: Los Resultados obtenidos se refieren únicamente a la Muestra analizada.-

CONCLUSION: La muestra analizada es: **YERBA MATE ELABORADA SIN PALO** Se ajusta a las especificaciones técnicas del Código Alimentario Argentino Art. N° 1.193, 1.194 y 1.195 (de acuerdo a las determinaciones Físico-químicas efectuadas).-





 Sr. Mg. ARMANDO LUIS CARETE

 Instituto Nac. de Alimentos

 DELEGACIÓN POSADAS

Coop. de Trabajo La Hoja Ltda.

Dom. Legal: Pasaje Sarandi 3164 -2000 Rosario – Santa Fe.
 Dom. Real.: Ruta Prov. 210 km 2 ½ - 3322 San Ignacio
 INAES Mat. Nro: 52441

CERTIFICATE OF LABORATORY ANALYSIS.

<u>Analysis n°:</u>	ANMAT Posadas, Po. 08278 – 26-05-16		
<u>Date:</u>	May 26, 2016		
<u>Sample:</u>	Mate Herb (Yerba Mate) elaborated without stems mark "DON LUCAS"		
<u>R.N.E. n°</u>	14.000.116	Envasado / packing	30 APRIL/2016
<u>R.N.P.A.n°</u>	14.000.286	Vencimiento /Maturity	30 April/2019
<u>SAMPLE DESCRIPTION :</u>			
Original packaging, containing a desiccated vegetal product, grounded, in green colour with it's characteristic flavor and aroma.			
<u>CARRY OUT DETERMINATIONS:</u>		<u>PHISICIST-CHEMICAL ANALYSIS</u>	
• Product trade mark	DON LUCAS		
• Conervation status:	Good.		
• Organoleptic characteristics	Satisfactory		
• Humidity: (100-105° C)	5.9		Gr. %
• Total ashes (500 - 550° C)	6.67		Gr. %
• Insolubles Ashes CIH to 10 %	1.5		Gr. %
• Aqueous Extract AOAC	32.19		Gr. %
• Caffeine (Cortes's Method) SPS	1.17		Gr. %
<u>SIEVING</u>			
• Stems total	4.16		Gr. %
• Leaves total (desiccated, broken or pulverized)	95.84		Gr. %
• Declared Net Weight	500		Gr.
• Real Net Weight	500		Gr. %
<u>GENUINITY:</u>			
• Extraneous vegetal substances	Less than 1		Gr. %
• Yerba Mate seeds	Less than 1		Gr. %
<u>MICROSCOPIC EXAMINATION: (Scala's Method).</u>			
Observed: cytological and histological characteristic structures of the ILEX PARAGUARIENSIS.			
<u>CONCLUSION:</u>			
The analyzed sample is: Elaborated Yerba Mate without stems. Fit for human consumption It is adjusted to the technical specifications of the ARGENTINE FOOD CODE in accordance with it's articles n° 1.193; 1194 clause and 1995 (according to the physicochemical parameters made).-			

Coop. de Trabajo La Hoja Ltda.

Dom. Legal: Pasaje Sarandi 3164 -2000 Rosario – Santa Fe.
Dom. Real: Ruta Prov. 210 km 2 ½ - 3322 San Ignacio
INAES Mat. Nro: 52441

CERTIFICATE OF LABORATORY ANALYSIS: Microbiological Examination.

<u>Analysis n°:</u>	ANMAT Posadas, Po. 08278 – 26-05-16		
<u>Date:</u>	May 26, 2016		
<u>Sample:</u>	Mate Herb (Yerba Mate) elaborated without stems mark "DON LUCAS"		
<u>R.N.E. n°</u>	14.000.116	Envasado / packing	30 APRIL/2016
<u>R.N.P.A.n°</u>	14.000.286	Vencimiento /Maturity	30/April/2019
<u>SAMPLE DESCRIPTION :</u>			
Original packaging, containing a desiccated vegetal product, grounded, in green colour with it's characteristic flavor and aroma.			
<u>CARRY OUT DETERMINATIONS:</u>			
	<u>Microbiological Examination</u>		
Product trade mark	DON LUCAS		
Recuento total de bacterias aerobias mesofilas en agar Plate count,- Total count of aerobic mesophilic bacteria agar Plate count , 24-28hs, 35-37°C	UFC/g	1x10 ⁴	
Recuento de Coliformes totales en agar Rojo Bilis violeta - Total coliform count Violet Red Bile Agar 24-48hs, 35-37°C	UFC/g	Less tan 50	
Coliformes fecales en 1 gramo - Fecal coliforms in 1g		Absence	
Recuento total de Mohos y levadura en agar YGC – Total yeast and mold count agar YGC, 3-5 dias, 20-25°C	UFC/g	More than 10 ⁴	
The analyzed sample is: Elaborated Yerba Mate without stems. Fit for human consumption.			
It is adjusted to the technical specifications of the ARGENTINE FOOD CODE in accordance with it's articles n° 1.193; 1194 clause and 1995 (according to the physicochemical parameters made).-			
Notes: The sample was taken and analyzed by the applicant.			



Юридический адрес: ООО «ХАРМС», Россия 191167, Санкт-Петербург, ул. Александра Невского, д. 9, литер А, пом.306 тел. 327-07-76, тел./факс 274-83-19
 Адрес производства: ООО «ХАРМС», Россия 181330, Псковская обл., Островский район, Воронцовская волость, с.Воронцово, ул. Советская, д. 161 тел.(81152)93144, тел./факс (81152)93298

ЛИЦЕНЗИЯ
 МИНИСТЕРСТВА
 ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ТОРГОВЛИ РФ
 № 11543-ЛС-П от 27 февраля 2012 г

ПАСПОРТ № 44 Б от 17.02.15

Элеутерококка экстракт сухой

Серия 010215 Дата изготовления 11.02.15 Дата выпуска 17.02.15
 Годен до 03.2018 Количество продукции 3,0 кг
 Анализ выполнен по ГФ Х1 и СанПиН 2.3.2.1078-01

Наименование показателей по НД	Норма по НД	Результаты испытаний
Описание	Аморфный порошок от желтого, серовато-желтого до светло-коричневого, серовато-коричневого и коричневого цвета со специфическим запахом. Гигроскопичен, комкуется.	Соответствует
Подлинность	Удовлетворяет качественной реакции на фенольные соединения	Соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 8 %	5,5 %
Количественное определение	Содержание суммы элеутерозидов, %	6,7 %
Тяжелые металлы	Не более 0,01 %	Соответствует
Микробиологическая чистота	Не более $5,0 \cdot 10^4$ КМАФАнМ, КОЕ/г	Соответствует
	БГКП (колиформы) отсутствие в 0,1 г	Отсутствие
	Escherichia coli- отсутствие в 1 г	Отсутствие
	Staphylococcus aureus-отсутствие в 1 г	Отсутствие
	Патогенные сальмонеллы отсутствие в 10,0 г	Отсутствие
	Дрожжи, КОЕ/г не более 100	Соответствует
Маркировка	На этикетке указывается предприятие изготовитель, его товарный знак, название препарата; количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, дата изготовления, штриховой код.	На этикетке указано предприятие изготовитель, его товарный знак, название препарата, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, дата изготовления.
Упаковка	Пакеты полиэтиленовые двойные, вложенные в ящики из картона гофрированного.	Соответствует

Заключение: Соответствует требованиям ГФ Х1 и СанПиН 2.3.2.1078-01

Химик
 Отдел
 контроля качества
 Заместитель генерального
 директора по качеству



 Краснова Е.А.

 Тасев Е.Д.

ОАО «Марбиофарм»

424006 Республика Марий Эл
г. Йошкар-Ола
ул. К.Маркса, 121Отдел контроля качества
Тел./факс (8362) 41-73-01

ПАСПОРТ 1917

Наименование продукции по НД **Янтарная кислота субстанция**
 Номер серии 150914
 Количество (масса), ед. измерения 425 кг (17 меш х 25 кг)
 Дата выпуска продукции 6 октября 2014 г
 Анализ выполнен по ФСП Р N000493/01-160911
 (наименование, индекс и номер нормативной документации)

№ п/п	Наименование показателей	Требования нормативной документации	Результаты испытаний
1	Описание	Белый крупнокристаллический порошок или прозрачные бесцветные кристаллы	Белый кристаллический порошок (в соответствии с требованиями потребителя)
2	Растворимость	Очень легко растворим в кипящей воде, растворим в воде и спирте 96%, практически не растворим в хлороформе.	Очень легко растворим в кипящей воде, растворим в воде и спирте 96%, практически не растворим в хлороформе.
3	Подлинность	Качественная реакция	Подтверждена
4	Температура плавления, °С	От 184 до 188	185,9
5	Прозрачность раствора	3% раствор должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I	Прозрачный
6	Цветность раствора	3% раствор должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном В ₂	Бесцветный
7	Сульфаты, %	Не более 0,005	Менее 0,005
8	Хлориды, %	Не более 0,001	Менее 0,001
9	Сульфатная зола, %	Не более 0,1	0,02
10	Тяжелые металлы, %	Не более 0,001	Менее 0,001
11	Соли аммония, %	Не более 0,005	Менее 0,005
12	Потеря в массе при высушивании, %	Не более 0,5	0,23
13	Содержание янтарной кислоты, %, в пересчете на сухое вещество	Не менее 99,5	99,8
14	Микробиологическая чистота	Соответствие ГФ XII, кат. 2.2	Соответствует
15	Упаковка	Согласно требованиям ФСП Р N000493/01-160911	По 25 кг в двойной мешок из пленки полиэтиленовой, в мешок бумажный
16	Маркировка	Согласно требованиям ФСП Р N000493/01-160911	Соответствует
17	Срок годности	4 года	до 10 2018
18	*Вещества, восстанавливающие КМnO ₄	Окраска раствора должна сохраняться в течение 5 минут	Соответствует
Хранение. В сухом месте при температуре не выше 25°C Заключение ОКК: Соответствует ФСП Р N000493/01-160911, требованиям потребителя.			

*По требованию потребителя

Начальник ОКК



Р.Ф. Хамидулина



Приложение К. Лабораторный регламент на производство экстракта листьев
падуба парагвайского (*Plex Paraguariensis*) сухого

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной
деятельности ГБОУ ВПО

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

С.Б. Шевченко



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство экстракта листьев и черешков падуба парагвайского (*Plex
paraguariensis*) сухого

Срок действия регламента до «__» _____ 20__ г.

(дата)

Москва 2015г

 А.А. Свистунов