

ГРЕЦКИЙ СЕРГЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
РАБОТОСПОСОБНОСТИ НА ОСНОВЕ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук,
доцент

Павлова Людмила Анатольевна

Официальные оппоненты:

Егорова Светлана Николаевна – доктор фармацевтических наук, профессор, Института фармации ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по образовательной деятельности

Олешко Ольга Алексеевна – доктор фармацевтических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической технологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки РФ)

Защита состоится «__» _____ 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д **208.040.09**

доктор фармацевтических наук,
профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время перед фармакологией спорта остро стоит проблема поиска эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС), способствующих повышению спортивных результатов, ускоряющих восстановительные процессы после нагрузки, снижающих их негативные последствия и улучшающих качество жизни спортсменов. Одним из перспективных направлений в создании лекарственных средств, применяемых в фармакологическом сопровождении спортсменов, является использование комбинации актопротекторов, гепатопротекторов и витаминов.

Среди препаратов с актопротекторной активностью выделяют специфические (бемитил и др. производные имидазола), синтетические (мексидол, вита-мелатонин), витаминные препараты (В, С, Р, Е) и препараты растительного происхождения (экстракты женьшеня, лимонника, родиолы розовой и др.). При этом представляют несомненный интерес ЛС, включающие комплекс актопротекторов, гепатопротекторов и витаминов. В качестве таких средств на российском рынке сегодня представлены только биологически активные добавки, например, Адаптон, Леветон, Элтон и др. (Крендаль Ф.П., 2007, Сейфулла Р.Д., 2011)

В то же время, известны лекарственные растения, обладающие актопротекторными и гепатопротекторными свойствами. Родиола розовая (*Rhodiola rosea*) известна как одно из растений, обладающих адаптогенными и актопротекторными свойствами, обеспечивающими быстрое восстановление организма после перенесенной нагрузки (Крендаль Ф.П., 2007; Куркин В.А., 2015; Pannossian A., 2010.). Немаловажным фактором является также наличие у Родиолы розовой антигипоксического, антистрессорного, антитоксического и антиоксидантного эффектов (Темирбулатова А.М., 2017, Крендаль, 2007, Куркин В.А., 2015).

Целесообразность введения в состав комбинированного препарата плодов шиповника собачьего (*Fructus Rosae*) обусловлена наличием у него гепатопротекторного действия (Баимуродов Р.С., 2017).

Кроме того, восстановительным процессам в организме необходимы витамины, флавоноиды, микроэлементы, которые содержатся в столбиках с рыльцами кукурузы (Халилова Р.С., 2017, Никифорова Е.Б., 2007, Кукес В.Г., 2011).

Использование комбинаций лекарственных растений, которые в силу своего химического состава, обладают сочетанным действием на организм и имеют при этом невысокий уровень побочных реакций, позволяет решить указанную выше проблему.

В то же время, до настоящего времени не разработаны лекарственные средства, содержащие в своем составе комплекс лекарственных растений, обеспечивающих максимальную актопротекторную эффективность применения в спортивной медицине, что обусловило актуальность выбранной темы и стало целью настоящих исследований.

Степень разработанности темы исследования

Разработка эффективных и безопасных лекарственных средств, способствующих восстановительным процессам после нагрузок и снижающих негативные последствия последних, представляет огромный интерес. До настоящего времени не проводилась разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного средства на основе родиолы розовой, шиповника собачьего и кукурузы майской в виде твердых желатиновых капсул с гранулированными сухими экстрактами.

Цель исследования: разработка и исследование комплексного лекарственного средства на основе родиолы розовой, шиповника собачьего и кукурузы майской, обладающего адаптогенным и актопротекторным действием, обеспечивающим повышение работоспособности.

Задачи исследования:

1. Провести информационно-аналитическое исследование в отношении лекарственного растительного сырья (ЛРС), входящего в состав ЛС, его химического состава, фармакологической активности, применения, процессов выделения суммы действующих веществ из него и различных аспектов создания лекарственной формы (ЛФ).
2. Разработать ресурсосберегающую технологию получения сухих экстрактов из

корневищ и корней родиолы розовой, плодов шиповника собачьего и столбиков с рыльцами кукурузы.

3. Разработать состав и технологию получения комбинированного ЛС в виде твёрдых желатиновых капсул.
4. Определить показатели качества полученных сухих экстрактов и ЛФ на их основе. Отработать оригинальные ВЭЖХ методики по определению показателей подлинности и количественного содержания действующих веществ в ЛРС, сухих экстрактах и готовой ЛФ.
5. Исследовать эффективность разработанного ЛС: изучить специфическую активность и осуществить подбор дозы путём исследования на животных.
6. Разработать НД на капсулы комплексного препарата родиолы розовой.
7. Разработать лабораторный регламент на производство комплексного препарата на основе лекарственного растительного сырья родиолы розовой в твердых желатиновых капсулах.

Научная новизна

Впервые разработана технология получения сухих экстрактов (СЭ) из корневищ и корней родиолы розовой, плодов шиповника собачьего и столбиков с рыльцами кукурузы с использованием различных методов экстрагирования. Впервые разработана технология гранулирования смеси данных СЭ современным методом влагоактивизированной грануляции (ВАГ), позволяющим получить продукт с необходимыми технологическими свойствами. Впервые разработана технологическая схема и обоснованы технологические параметры получения лекарственной формы (твёрдые желатиновые капсулы) из сухих экстрактов ЛРС. Предложены и отработаны оригинальные варианты методик ВЭЖХ по определению показателей подлинности и количественного содержания действующих веществ в СЭ и готовой ЛФ (подобраны подвижные фазы, градиент, температура колонки, скорость потока растворителей.). Изучена эффективность и безопасность разработанного комбинированного ЛС *in vivo*: определена острая токсичность и актопротекторное действие.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

На основании проведенных исследований научно обоснована целесообразность выбора метода экстракции для получения СЭ с высоким содержанием действующих веществ для исследуемого ЛРС и показана перспективность применения ВАГ. Практическая значимость работы заключается в подборе состава гранулята, содержащего СЭ ЛРС и разработке на технологической схеме получения твёрдых желатиновых капсул; отработке оригинальных вариантов методик ВЭЖХ для подтверждения подлинности и определения содержания действующих веществ в СЭ и готовой ЛФ; разработке комбинированного ЛС в виде твердых желатиновых капсул на основе СЭ родиолы розовой, плодов шиповника собачьего, столбиков с рыльцами кукурузы, обладающего актопротекторным и адоптагенным действием.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования по подбору наиболее эффективных методов экстрагирования действующих веществ из корневищ и корней родиолы розовой, плодов шиповника собачьего, столбиков с рыльцами кукурузы.
2. Результаты качественного и количественного анализа извлечений, полученных из ЛРС.
3. Результаты изучения фармако-технологических свойств полученных сухих экстрактов корневищ с корнями родиолы розовой, плодов шиповника собачьего, столбиков с рыльцами кукурузы.
4. Результаты обоснования состава, технологии и стандартизации твёрдых желатиновых капсул с полученными сухими экстрактами.
5. Результаты оценки фармакологической эффективности полученного комбинированного препарата из ЛРС родиолы розовой, шиповника собачьего, кукурузы майской.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили работы российских ученых (Давыдовой В.Н., Николаевой И.Г., Кауховой И.Е., Деминой Н.Б. и др.) в области разработки научных основ получения лекарственных средства на основе ЛРС.

В ходе проведения экспериментальных исследований были использованы различные методы экстракции (противоточное многоступенчатое экстрагирование, мацерация с принудительной циркуляцией экстрагента, вакуум-фильтрационная экстракция, реперколяция с законченным циклом), а также метод ВАГ. Для определения показателей качества полученных извлечений, сухих экстрактов и гранулятов, использованы методы градиентной ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС, комплекс фармакопейных физико-химических и технологических методов анализа, математические методы анализа и обработки результатов.

Достоверность научных положений и выводов

Степень достоверности результатов диссертационной работы подтверждается использованием современных методик исследования, сертифицированного оборудования, валидацией методик анализа и статистической обработкой экспериментальных данных.

Апробация результатов исследования

Основные положения экспериментальных исследований диссертационной работы представлены и обсуждены на международной научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» (2012, Москва); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (2013, Санкт-Петербург); научно-практической конференции «Аспирантские и докторантские чтения: моделирование научного исследования – форсайт-технологии» (2013, Москва); научно-практической конференции «Современные аспекты использования РС и сырья природного происхождения в медицине» (2013, Москва); Научном совете НИИ фармации «Достижения и перспективы молодых ученых НИИ фармации» (2014, Москва); межкафедральной конференции кафедр фармацевтической технологии, фармацевтической технологии и фармакологии, фармацевтического естествознания Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (ноябрь 2018, Москва).

Личный вклад автора

Автором лично были определены цели и задачи исследования, разработаны

методологические подходы к их решению, проведён анализ научной литературы, проведены экспериментальные исследования, анализ полученных результатов и их статистическая обработка. Автором написаны публикации и проект лабораторного регламента. Диссертация и автореферат написаны лично автором. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном его участии в качестве исполнителя на всех этапах исследования.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс курса фармацевтической технологии, кафедры организации фармацевтической деятельности фармацевтического факультета ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России (Акт внедрения от 29.12.2014 года), в учебный процесс и научную деятельность кафедры фармацевтической технологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. Сеченова Минздрава России (Акт внедрения от 07.12.2018 года), в учебный процесс и научную деятельность кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Акт внедрения от 07.12.2018 года), разработан проект НД и лабораторный регламент на производство комплексного препарата на основе ЛРС родиолы розовой в твердых желатиновых капсулах. Апробация технологии разработанного ЛС проведена на базе предприятия ООО «Хармс» (Акт апробации технологии № 3 от 25.05.2018 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – «технология получения лекарств» (фармацевтические науки). Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3 и 4 паспорта специальности 14.04.01 - Технологии получения лекарств.

Связь задач исследования с проблемами фармацевтической науки

Работа выполнена в соответствии с тематикой и планом ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и

инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01201261653).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста (134 страницы основного текста), состоит из введения, обзора литературы, главы 2, посвященной объектам и методам исследования, 3-6 глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы, приложений, содержит 43 таблицы и 38 рисунков. Библиографический указатель включает 190 источников, из которых 40 на иностранных языках.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 12 печатных работ, в том числе 4 статьи опубликованы в изданиях, входящих в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации, рекомендуемых ВАК РФ, 1 статья - в зарубежном журнале.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлось лекарственное растительное сырье корневища и корни родиолы розовой, плоды шиповника собачьего и столбики с рыльцами кукурузы майской.

Материалы и методы исследования

Получение извлечений из ЛРС осуществляли по разработанным методикам. Изучение химического состава ЛРС, извлечений из него и готовой ЛФ проводили методами градиентной ВЭЖХ на хроматографе Waters Breeze (США) с УФ-детектором 2487 и ВЭЖХ-МС на приборе Agilent 1200 (США) с программным обеспечением ChemStation B.03.01-SR1. В качестве стандартных образцов (СО) использованы: розин, розарин, розавин, салидрозид, тирозол, рутин (Chromadex, США), а также кверцетин, аскорбиновая и хлорогеновая кислоты (Sigma-Aldrich). При определении витаминов использованы СО витаминов В₁, В₂, В₆, А, D и К (Chromadex, США).

Для получения сухих экстрактов применяли метод сублимационной сушки. Сухие экстракты родиолы розовой, шиповника собачьего и столбиков с рыльцами кукурузы майской (СЭРШК) получали по общей схеме – давление 72 мБар, температура бани 60 °С и скорость вращения колбы 120-140 об/мин. Затем сгущённое извлечение помещали в морозильную камеру с температурой 25 °С на 6-8 часов и высушивали в сублимационной сушилке Heto Drywinner CT/DW 60E (США) с вакуумно-роторным насосом RZ 2 (Vacuumbrand, Германия) при давлении 0,010 мБар и температуре 21 °С, в течение не менее 18 часов.

Для полученной смеси СЭРШК определяли следующие показатели качества: фракционный состав, сыпучесть, насыпную массу, влажность, гигроскопичность, согласно методикам, описанным в ГФ РФ.

При проведении исследований по разработке ЛФ в виде твёрдых желатиновых капсул с сухими растительными экстрактами использовали вспомогательные вещества фармакопейного качества. Исследование процесса гранулирования сухих растительных экстрактов проводили с использованием универсального лабораторного гранулятора модели TMG Glatt (Германия). Наполнение твёрдых желатиновых капсул проводили на настольной капсульной машине ACG Pam MF 30 (Индия).

Полученную готовую ЛФ, согласно требованиям ГФ РФ ОФС. 1.4.1.005.18 «Капсулы», оценивали по показателям качества: подлинность, описание, однородность массы, распадаемость, растворение, количественное определение, микробиологическая чистота. Испытание на распадаемость проводили по методике ГФ РФ ОФС 1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» на приборе «Качающаяся корзинка» ERWEKA CZ 221 в среде 0,1 М хлористоводородной кислоты. Растворение капсул определяли по методике, описанной в ГФ РФ ОФС. 1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» на приборе растворения ERWEKA DT600 с «Лопастной мешалкой» (скорость вращения 50 об/мин) в среде 0,1 М хлористоводородной кислоты в течение 45 минут. Объем среды растворения – 800 мл, температура 37±2 °С.

Оценку эффективности разработанного препарата проводили *in vivo* в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению

новых фармацевтических веществ» (2012, Миронов А.Н.). Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода вариационной статистики с использованием Т-критерия Стьюдента. Статистически значимыми признавались различия при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США).

Разработка технологии получения экстрактов из ЛРС

Для получения извлечения из корневищ и корней родиолы розовой, был выбран метод, используемый для промышленного получения жидкого экстракта родиолы розовой: извлечение из корневищ и корней родиолы розовой проводили методом противоточного многоступенчатого экстрагирования в батарее из 5 диффузоров. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 40 %, соотношение сырье-готовый продукт 1:1, степень измельченности - не более 7 мм.

Экстракцию БАВ из плодов шиповника собачьего проводили методом 3-кратной мацерации. Время 1-ой экстракции – 2 часа, 2-ой – 1,5 часа, 3-ей – 1 час 15 мин. Выбор метода производили из четырех вариантов модификаций: с использованием измельченного до 0,5 мм (1 и 3 варианты) и не измельченного ЛРС (2 и 4 варианты). Экстрагентом во всех случаях являлась вода очищенная (50 ± 5 °С) в соотношении сырье-экстрагент 1:10. В 3 и 4 вариантах в дополнение к описанной схеме после настаивания отделяли концентрированное извлечение в количестве 1/5 от общего объема, оставшееся извлечение подвергали циркуляции в течение 30 мин. Полученные извлечения объединяли и отстаивали в течение 24 часов при температуре 2-8 °С, фильтровали и оценивали по содержанию кислоты аскорбиновой и флавоноидов методом ВЭЖХ по оригинальным методикам. Результаты исследований свидетельствуют, что метод 3-кратной мацерации с циркуляцией экстрагента (3-й вариант) по полноте извлечения действующих веществ, являлся наиболее предпочтительным (табл. 1).

Подбор метода получения извлечения из столбиков с рыльцами кукурузы включал в себя экспериментальное изучение 3-х вариантов экстракции: вакуум-фильтрационное экстрагирование (1 и 2 варианты) и реперколяция с законченным циклом (3-й вариант). В 1-м случае спирт рекуперировали и экстрагировали БАВ из

шрота методом ремацерации горячей водой, во 2-м случае рекуперацию спирта не проводили. Во всех 3-х вариантах полученные извлечения декантировали и анализировали.

Таблица 1 - Содержание БАВ в извлечениях плодов шиповника собачьего

Вариант экстракции	Содержание аскорбиновой кислоты, мкг/мл	Содержание хлорогеновой кислоты, мкг/мл	Содержание кверцетина, мкг/мл	Содержание рутина, мкг/мл
Вариант 1	49,10±0,03	0,143±0,02	0,041±0,02	0,112±0,03
Вариант 2	46,54±0,02*	0,134±0,02	0,050±0,02	0,117±0,04
Вариант 3	54,92±0,03*	0,201±0,01	0,063±0,03	0,121±0,01
Вариант 4	45,64±0,02*	0,161±0,01	0,051±0,04	0,119±0,04

Примечание. Число наблюдений (n) = 5.

* - Достоверные различия с результатом экстрагирования методом 1 (P<0,05).

Учитывая содержание термолabileльных веществ в столбиках с рыльцами кукурузы, представлялось целесообразным не повышать температуру экстрагирования на стадии извлечения водой выше 65 °С. Проведены исследования по отработке температурного режима, в которых температуру экстракции варьировали от 20 до 65 °С, в результате чего установлено, что оптимальным температурным режимом является 50 – 55 °С (табл. 2).

Таблица 2 - Зависимость выхода анализируемых витаминов от температуры экстракции*

Анализируемое вещество	Температура экстракции, °С				
	20-25	30-35	40-45	50-55	60-65
Витамин А	0,00165	0,00171	0,00171	0,00175	0,00169
Витамин В ₁	0,01012	0,01015	0,01020	0,01038	0,01020
Витамин В ₂	0,06195	0,06204	0,06542	0,07400	0,07200
Витамин В ₆	0,00145	0,00158	0,00256	0,00314	0,00247
Витамин С	0,60061	0,62399	0,63108	0,70828	0,64748
Витамин К	0,00667	0,00751	0,00767	0,00968	0,00748

*В таблице приведены средние данные по трем измерениям

Для оценки эффективности сравниваемых методов экстрагирования, проводили определение в них и действующих веществ (табл. 3).

Таким образом, установлено, что технология получения извлечений из столбиков с рыльцами кукурузы по 2-й методике является оптимальной. Сухие экстракты из ЛРС получали методом сублимационной сушки в условиях, описанных в разделе «Материалы и методы исследования».

Таблица 3 - Сравнительная оценка содержания витаминов в жидких экстрактах столбиков с рыльцами кукурузы

Показатель	Извлечение, схема 1, %	Извлечение, схема 2, %	Извлечение, схема 3, %
Витамин А	0,00181*	0,00293 ^{*,**}	0,00154
Витамин В ₁	0,01020*	0,01053 ^{*,**}	0,01014
Витамин В ₂	0,07692*	0,08741 ^{*,**}	0,06705
Витамин В ₆	0,00196*	0,00363 ^{*,**}	0,00192
Витамин С	0,60849*	0,73176 ^{*,**}	0,60197
Витамин К	0,00669*	0,01020 ^{*,**}	0,00854

* - достоверное различие с экстракцией методом реперколяции с законченным циклом (схема 3) ($P < 0.05$); ** - достоверное различие с методом вакуум-фильтрационного экстрагирования с рекуперацией этанола (схема 1) ($P < 0.05$).

Изучение химического состава СЭРШК и отработка оригинальных вариантов методик определения показателей качества СЭРШК и готовой ЛФ

Смесь сухих экстрактов СЭРШК получали путём смешивания СЭ родиолы, шиповника и кукурузных рылец в соотношении 1:1:1 (дозы рассчитывали из среднесуточных доз монопрепаратов ЛРС) в универсальном Y-смесителе фирмы ERWEKA YB 5. Методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС определяли основные группы БАВ в составе смеси СЭРШК. Из таблицы 4 видно, что в составе смеси СЭРШК салидрозид является основным действующим веществом экстракта родиолы розовой, аскорбиновая кислота входит в состав плодов шиповника и столбиков с рыльцами кукурузы, кверцетин входит в состав всех трёх СЭ. Поэтому, капсулы предложено стандартизовать по действующим веществам: салидрозиду и аскорбиновой кислоте.

Оригинальные варианты методик были валидированы, согласно требованиям ГФ РФ ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», по параметрам специфичности, линейности, прецизионности, и установлено, что все они специфичны, имеют линейную зависимость между концентрацией исследуемых веществ и площадью пика (r более 0,999) и дают сопоставимые результаты ($RSD < 2\%$).

Таблица 4 - Содержание биологически активных веществ в смеси СЭРШК

Наименование БАВ	Содержание
	В 100 г (смеси сухих экстрактов), мкг/мг
Хлорогеновая кислота	0,240±0,023
Кверцетин	12,11±1,2
Рутин	7,07±0,36
Розавин	1,69±0,1
Розарин	4,35±0,2
Розин	1,49±0,1
Салидрозид	26,47±1,4
Тирозол	11,08±0,5
Аскорбиновая к-та	54,12±0,01
Витамин А	0,0278±0,003
Витамин В ₁	0,1±0,01
Витамин В ₂	0,8±0,02
Витамин В ₆	0,04±0,005
Витамин К	0,1 ±0,02

Получение гранулята смеси СЭРШК

Технологические характеристики полученной смеси СЭ приведены в таблице 5. Показано, что полученная смесь СЭ обладает низкой сыпучестью и может значительно уплотняться, создавая проблемы в технологическом процессе при заполнении желатиновых капсул и транспортировке. Для устранения данного недостатка использовали прием гранулирования. Результаты отработки технологии гранулирования смеси СЭРШК приведены в таблице 6.

Таблица 5 - Технологические свойства смеси сухих экстрактов

№ п/п	Технологические показатели	Смесь сухих экстрактов СЭРШК
1.	Сыпучесть, г/с	2,4 ± 0,05
2.	Угол естественного откоса, °	45 ± 1,90
3.	Свободная насыпная плотность, кг/м ³	725 ± 3,10
4.	Предельная насыпная плотность, кг/м ³	874 ± 2,41
5	Влажность, %	4,86 ± 0,01

Таблица 6 - Составы гранулируемых смесей

№	Состав смеси	№	Состав смеси
1	СЭРШК — 66 % Starlac® — 33 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4% от массы смеси	7	СЭРШК — 66 % Starlac® — 33 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 5 % от массы смеси
2	СЭРШК — 66 % Kleptose® — 4 % Aeroperl® 300 pharma — 2 % Лактоза моногидрат — 28 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 5 % от массы смеси	8	СЭРШК — 70 % Крахмал — 20 % Лактоза моногидрат — 9 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4 % от массы смеси
3	СЭРШК — 57 % Лактоза — 28 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Kleptose® — 14 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 3 % от массы смеси	9	СЭРШК — 66 % Крахмал — 26 % Лактоза моногидрат — 7 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 3 % от массы смеси
4	СЭРШК — 66 % Kleptose® — 4 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Лактоза — 29 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70% - 4% от массы смеси	10	СЭРШК — 77 % Ликатаб — 15 % Vivapur® 101 — 5 % Aeroperl® 300 pharma — 3 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4 % от массы смеси
5	СЭРШК — 65 % Kleptose® — 2 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Лактоза моногидрат — 32 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4 % от массы смеси	11	СЭРШК — 86 % Крахмал — 6 % Лактоза моногидрат — 7 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4 % от массы смеси
6	СЭРШК — 66 % Starlac® — 25 % Vivapur® 200 — 8 % Aeroperl® 300 pharma — 1 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 3 % от массы смеси	12	СЭРШК — 66 % ProSolv®SMCC — 34 % Гранулирующий агент - спирт этиловый 70 % - 4 % от массы смеси

В качестве способа получения гранулята выбран метод ВАГ. Грануляцию проводили на универсальном лабораторном грануляторе TMG Glatt. Выбор режима работы гранулятора основан на предварительных испытаниях, в ходе которых визуально оценивали состояние смеси при гранулировании. На первой стадии процесса проводилось перемешивание ингредиентов до равномерного состояния, скорость мешалки составляла 150 об/мин., скорость измельчителя – 700 об/мин., время перемешивания – 3 мин. Вторая стадия (агломерация) включала добавление связующего вещества в количестве 3-5% от гранулируемой массы, в течение трёх минут мешалка и измельчитель работали в режиме 300 и 700 об/мин. соответственно,

а затем – 7 минут в режиме 400 и 1000 об/мин. Третья стадия (распределение, поглощение влаги и досушивание) длилась 10 минут, скорость мешалки и измельчителя составляла 400 и 1200 об/мин. соответственно. При этом смеси № 1, 3, 6 и 8 были исключены из дальнейших исследований в виду невозможности получения удовлетворительных гранулятов при визуальной оценке.

Оценку качества полученных гранулятов проводили по показателям: сыпучесть, насыпная масса, влагосодержание, гранулометрический состав (табл. 7, 8). Удовлетворительными качествами по всем показателям обладал гранулят № 9.

Таблица 7 - Технологические показатели гранулятов СЭРШК в сравнении с негранулированным продуктом.

№ гранулята	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса, град	Свободная насыпная плотность, кг/м ³	Предельная насыпная плотность, кг/м ³	Влажность, %
2	2,88±0,02	28±0,03	625±3,23	798±2,40	4,38±0,01
4	3,62±0,04	27±0,01	663±2,42	789±3,32	5,08±0,04
5	5,61±0,02	29±0,04	532±3,20	610±3,13	4,40±0,02
7	3,42±0,02	26±0,04	494±3,01	658±1,22	4,95±0,02
9	3,53±0,03	25±0,02	471±2,10	623±1,20	3,62±0,04
10	4,24±0,04	24±0,02	537±1,34	671±2,34	4,73±0,03
11	4,52±0,04	26±0,01	545±2,21	689±2,15	2,70±0,03
12	3,35±0,03	33±0,01	446±2,20	636±3,43	4,36±0,03
Смесь СЭРШК	2,4 ± 0,05	45 ± 1,90	725±3,10	874±2,41	4,86±0,01

Таблица 8 - Фракционный анализ гранулятов

№	m < 0,2 мм, %	m < 0,5 мм, %	m > 0,5 мм, %
2	54,4±0,02	22,6±0,03	23,0±0,02
4	56,4±0,02	23,2±0,02	20,4±0,01
5	62,3±0,03	27,4±0,02	7,3±0,01
7	24,3±0,02	51,2±0,04	24,5±0,02
9	21,7±0,02	44,9±0,04	33,4±0,04
11	54,3±0,03	31,2±0,04	14,5±0,02
12	37,9±0,02	44,4±0,02	17,8±0,03

Разработка технологии получения капсул с гранулятом СЭРШК-9

Разработку технологии капсулирования полученного гранулята проводили согласно данным литературы по средним суточным и разовым дозам используемого ЛРС. Для выполнения поставленной задачи выбран размер капсулы № 00 (табл. 9).

Таблица 9 – Содержание действующих и вспомогательных веществ в одной капсуле

Наименование вещества	Содержание, мг
Гранулят СЭРШК-9	375
Крахмал картофельный	148
Лактоза моногидрат	40
Аероpearl® 300	6
Итого	569

Наполнение твёрдых желатиновых капсул проводили в настольной капсульной машине ACG – Pam MF 30 в соответствии с технологической схемой, представленной на рисунке 1. Показатели качества готовой ЛФ приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Спецификация на готовую лекарственную форму – капсулы, содержащие СЭРШК-9

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуально	Белые, желатиновые капсулы размера 00, наполненные гранулами светло-коричневого цвета
Подлинность	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика салидрозида на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме СО салидрозида
Однородность массы	ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм»	Невскрытых капсул: 0,673 г ± 10 %; Содержимое капсул: 0,568 г ± 10 %
Распадаемость	ОФС «Распадаемость таблеток и капсул»	Не более 20 минут
Растворение	ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм»	За 45 минут в раствор 0,1 Н хлористоводородной кислоты должно перейти не менее 75 % салидрозида
Микробиологическая чистота	ОФС «Микробиологическая чистота»	Категория 3Б
Количественное определение	ВЭЖХ	Аскорбиновая кислота – не менее 19,24 – не более 21,26 мг Салидрозид – не менее 9,26 – не более 10,24 мг Кверцетин – не менее 4,31 – не более 4,77 мг
Упаковка	Блистерная ячейковая упаковка из поливинилхлорида и алюминиевой фольги	
Хранение	В защищенном от света месте при температуре от 15 °С до 25 °С	

Определение срока годности твердых желатиновых капсул, содержащих гранулят СЭРШК-9, проводили путём хранения 5 серий капсул при температуре 18-22 С и влажности воздуха 64 ± 2 % (ГФ XIII ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности

лекарственных средств»)). Срок наблюдения составлял 24 месяца. Каждые 3 месяца исследовали внешний вид, среднюю массу, подлинность, количественное содержание, распадаемость, растворение. Установлено, что при хранении в естественных условиях показатели качества твердых желатиновых капсул остаются неизменными в течение всего срока наблюдения. Поэтому был установлен срок годности лекарственной формы 2 года.

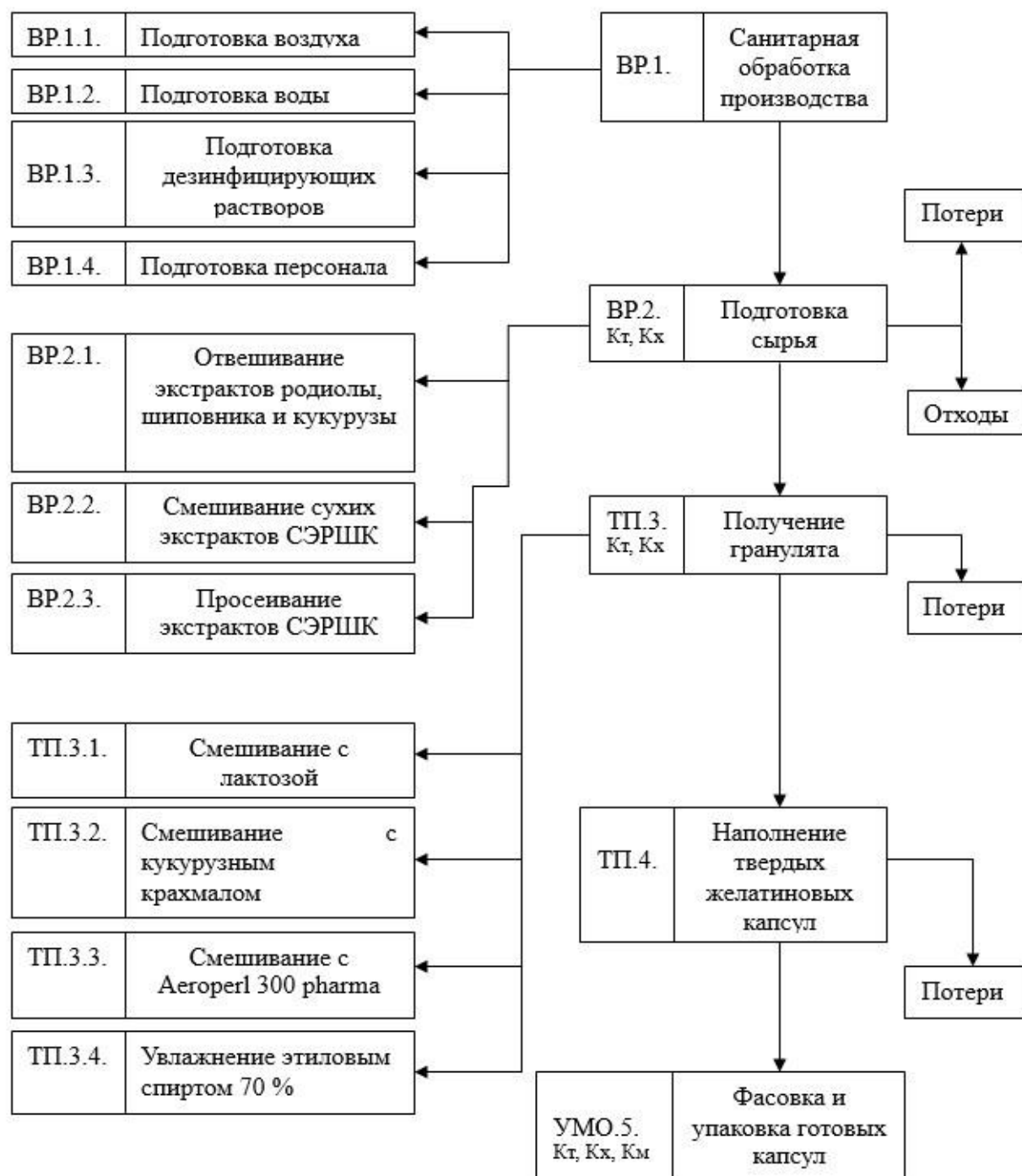


Рисунок 1. Технологическая схема получения твёрдых желатиновых капсул, содержащих СЭРШК-9

Определение токсичности твёрдых желатиновых капсул, содержащих гранулят СЭРШК-9

На первом этапе оценки эффективности ЛС проводили определение острой токсичности в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией А.Н. Миронова (часть первая - М. Гриф и К. - 2012. - 944 с.). Опыты проводились на 86 мышах-самцах массой 18-26 г. СЭРШК-9 вводили внутривентрикулярно, через зонд, предварительно растворив его в 2 мл воды. Вводимую дозу вводили в три приема с интервалом в 45 минут из-за густоты полученного раствора. Статистическая обработка результатов эксперимента по исследованию острой токсичности экстракта по показателю смертности экспериментальных животных по методу Кербера показала, что при однократном внутривентрикулярном введении белым беспородным мышам-самцам сухого экстракта СЭРШК-9, LD₅₀ составляет 33,3 г/кг ± 0,18 г (табл. 11).

Таблица 11 - Результаты определения LD₅₀ препарата СЭРШК-9.

№ п/п	Наименование препарата	Дозы г/кг	Количество животных			LD ₅₀ , г/кг
			В группе, шт	Выжило, шт	Погибло, шт	
1	СЭРШК-9	15	6	6	0	33,3±0,18
		21	6	5	1	
		27	6	3	3	
		33	6	3	3	
		36	6	1	5	
		42	6	0	6	

На основании полученных данных было установлено, что по степени токсичности СЭРШК-9 относится к 4у классу токсичности, т.е. малотоксичным веществам (Березовская И.В., 2003).

Определение актопротекторного действия

Изучение актопротекторного действия смеси СЭРШК-9 осуществляли при помощи теста «повторное плавание», определяющего среднюю устойчивость к физической нагрузке животного при плавании с грузом весом 7% от массы тела животного. Мыши были распределены случайным образом на пять групп: одна группа «контрольная» (получали воду очищенную), две группы «опытные» (получали водный раствор СЭРШК-9 в дозах 1,8 г/кг и 3,6 г/кг), две группы «сравнение» (получали водный

раствор деалкоголизированного экстракта родиолы розовой (Камелия) в дозах 0,5 г/кг и 1,0 г/кг).

В качестве критериев оценки актопротекторного действия использовали: время первичного плавания, время вторичного плавания и показатель восстановления работоспособности (продолжительность повторного плавания в процентах, относительно первичного плавания). В 21-й день эксперимента изучали физическую выносливость. Мышам крепили груз весом 7 % от массы тела мыши и заставляли плавать до полного утомления в сосуде с водой, позволяющим им свободно двигаться. Через час снова проводили испытание до полного утомления. Результаты представлены в таблице 12.

В процессе эксперимента было выявлено, что у контрольной группы после восстановительного периода не наблюдалось полного восстановления физической работоспособности. Продолжительность их повторного плавания составила 65 % от первичного показателя. В группе, принимавшей сухой экстракт родиолы (СЭР) в дозах 0,5 и 1,0 г/кг, было выявлено полное восстановление физической работоспособности и увеличение её в среднем на 36 %. У животных, которые принимали СЭРШК-9 в дозе 1,8 г/кг наблюдалось полное восстановление работоспособности с последующим её увеличением на 55 %, у животных, принимавших СЭРШК-9 в дозе 3,6 г/кг – на 60 %.

Таблица 12 - Влияние введения СЭРШК-9 на общую физическую выносливость мышей по тесту продолжительности повторного плавания

Исследуемые препараты	Доза, г/кг	Число наблюдений	Продолжительность первого плавания в минутах ($M \pm m$)	Продолжительность повторного плавания	
				мин.	%
Контроль		24	15,1±2,2	9,8*±1,2	65
СЭР	0,5	20	17,3±1,2	22,8**±1,8	132
	1,0	20	20,1±1,4	28,1**±1,8	140
СЭРШК-9	1,8	21	18,2±1,3	28,2**±2,8	155
	3,6	21	21,4±1,4	34,2**±2,8	160

Примечание: * - достоверное различие с результатом первого плавания животных той же группы ($P < 0,05$); ** - достоверное различие с соответствующим результатом контрольной группы ($P < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования. В результате проведенных исследований разработаны: технология получения СЭ из корневищ и корней родиолы розовой, плодов шиповника собачьего и столбиков с рыльцами кукурузы майской; технология гранулирования смеси данных СЭ методом влагоактивизированной грануляции; технологическая схема получения твердых желатиновых капсул из СЭ лекарственного растительного сырья. Предложены и отработаны оригинальные методики ВЭЖХ по определению показателей подлинности и количественного содержания действующих веществ в СЭ и готовой ЛФ. Изучена эффективность и безопасность разработанного комбинированного ЛС *in vivo*: определена острая токсичность и актопротекторное действие. Разработан проект НД и лабораторный регламент на технологию получения твердых желатиновых капсул комплексного препарата из ЛРС.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшей разработки темы обусловлены целесообразностью расширения ассортимента лекарственных средств актопротекторного действия для использования их в спортивной медицине с целью повышения стрессоустойчивости спортсменов к физическим и эмоциональным перегрузкам, сокращения сроков восстановительных процессов после нагрузок, улучшения качества их жизни.

ВЫВОДЫ

1. На основе проведенного информационно-аналитического исследования выбраны экстрагенты и методы экстракции, наиболее перспективные для получения сухих экстрактов корневищ и корней родиолы розовой, плодов шиповника, столбиков с рыльцами кукурузы, обоснован подбор вспомогательных веществ для получения комбинированного препарата в виде твердых желатиновых капсул.
2. Разработаны ресурсосберегающие технологии выделения комплекса действующих веществ из столбиков с рыльцами кукурузы и плодов шиповника собачьего методами трёхкратной мацерации измельченных плодов с циркуляцией экстрагента и методом вакуумно-фильтрационной экстракции без рекуперации

спирта соответственно. Обосновано использование метода противоточного экстрагирования для получения СЭ ЛРС.

3. Разработан состав и технология получения комбинированного ЛП для повышения работоспособности в виде твёрдых желатиновых капсул, наполняемых гранулятом сухих экстрактов корневищ с корнями родиолы розовой, плодов шиповника собачьего, столбиков с рыльцами кукурузы.

4. Определены показатели качества полученных СЭ и готовой ЛФ. Отработаны и валидированы оригинальные варианты методик градиентной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием для идентификации и количественного определения аскорбиновой и хлорогеновой кислот, флавоноидов (кверцетин, рутин), производных гликозидов (розавин, розин, розарин, салидрозид, тирозол), витаминов групп А, В, С, D и К. Установлен срок годности капсул СЭРШК, который составил 2 года.

5. Изучена эффективность и безопасность полученного комбинированного ЛС *in vivo* (острая токсичность, тест повторного плавания). Определена доза LD₅₀. Установлено увеличение актопротекторного действия по сравнению с контрольным препаратом.

6. Разработан проект НД на твердые желатиновые капсулы комплексного препарата родиолы розовой, 375 мг.

7. Разработан лабораторный регламент на технологию получения препарата актопротекторного действия, представляющего собой твердые желатиновые капсулы, наполняемые гранулятом СЭРШК.

Практические рекомендации

Результаты диссертационных исследований служат экспериментальным обоснованием целесообразности проведения полного объёма доклинических исследований разработанного комбинированного лекарственного средства в виде твердых желатиновых капсул на основе ЛРС с целью формирования досье и последующей регистрацией.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А., Коваленко А.Е., Кардонский Д.А., Еганов А.А. Разработка методики ВЭЖХ для оценки содержания действующих веществ в сухом экстракте родиолы розовой // **Бутлеровские сообщения.** - 2012. - Т. 32. - № 11. - С.85-90.
2. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А. Оценка содержания действующих веществ в сухом экстракте родиолы розовой // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» РХТУ им. Менделеева – Москва, 2012, С. 149-154.
3. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А., Кардонский Д.А., Еганов А.А., Коваленко А.Е. Разработка метода определения биологически активных веществ в сухом экстракте родиолы розовой // Традиционная медицина. - 2012. - № 5 – С. 206-209.
4. Печенкина И.Г., **Грецкий С.В.**, Козин С.В. Перспективы применения растительных средств неспецифического действия при хронических токсических поражениях печени. // Сборник материалов конференции «Инновации в здоровье нации. – 2013. – С. 184-185.
5. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А., Козин С.В. Перспектива разработки комбинированных лекарственных средств растительного происхождения для повышения физической работоспособности // Сеченовский вестник. - 2013. – С. 72-73
6. Коваленко А.Е., **Грецкий С.В.** Метод количественного определения действующих веществ в сухом экстракте шиповника собачьего // Сборник материалов конференции «Аспирантские и докторантские чтения: моделирование научного исследования – форсайт-технологии. – 2013. С. 9-10.
7. Козин С.В., Крендаль Ф.П., **Грецкий С.В.**, Левина Л.В. Гепатопротекторный компонент в защитном действии препаратов родиолы розовой при хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями // **Бутлеровские сообщения.** - 2014. - Т. 38. - № 4. - С.20-26.
8. **Грецкий С.В.** Определение острой токсичности сухого экстракта родиолы розовой // Сеченовский Вестник. – 2014. - № 2 (16) – С. 97-98.
9. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А. Получение гранулята из сухих экстрактов родиолы розовой, шиповника собачьего и кукурузных рылец методом влагоактивизированной грануляции // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 1. (электронный журнал: <http://www.science-education.ru/121-19051>).
10. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А. Метод исчерпывающей экстракции из плодов шиповника собачьего // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 1. (электронный журнал: <http://www.science-education.ru/121-18879>).

11. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А. Использование растительного сырья при создании препаратов актопротекторного действия // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. – 2015. – № 1. – С. 40-47.
12. **Грецкий С.В.**, Павлова Л.А. Научно обоснованный подход к выбору метода экстрагирования для получения сухого экстракта столбиков с рыльцами кукурузы // European Journal of Education and Applied Psychology. – 2018. – № 1. – С. 32-36.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

LD ₅₀	- ПОЛУлетальная доза, 50	ЛС	- лекарственное средство
БАВ	- биологически активное вещество	ЛФ	- лекарственная форма
БАД	- биологически активная добавка	НД	- Нормативная документация
ВАГ	-Влагоактивизированное гранулирование	СО	- Стандартный образец
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография	СЭР	- сухой экстракт родиолы
ВЭЖХ- МС	- высокоэффективная жидкостная хроматомасс- спектрометрия	СЭРШК	- сухой экстракт родиолы, шиповника и кукурузных рылец
ГФ	- государственная фармакопея	УФ	- ультрафиолет
ЛРС	- лекарственное растительное сырье	СЭ	- сухой экстракт