

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени И.К. АХУНБАЕВА**

ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ НАН КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Диссертационный совет Д 03.17.558

На правах рукописи
УДК: 615.32:615.412.5:615.45

ЖАНЫМХАНОВА ПЕРНЕШ ЖАЙДАРБЕКОВНА

**ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ОКСИМА
ПИНОСТРОБИНА И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ**

14.04.01- технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Бишкек - 2017

Работа выполнена в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Республика Казахстан

Научный руководитель: член-корреспондент НАН РК,
доктор фармацевтических наук,
профессор Итжанова Хорлан Искожиевна

Официальные оппоненты: доктор фармацевтических наук,
профессор Сагиндыкова Баян Ахметовна;

кандидат фармацевтических наук,
Токтоналиева Наргиза Усенбаевна

Ведущая (оппонирующая) организация: АО «Медицинский университет Астана» (Республика Казахстан, 010000, г. Астана, ул. Бейбитшилик, 49а)

Защита диссертации состоится: «_____» _____ 2017 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 03.17.558 при Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева по адресу: 720020, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГМА им. И.К. Ахунбаева по адресу: 720020, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92.
(<http://www.kgma.kg>)

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент**

Т.С. Сабирова

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АНД	-	Аналитический нормативный документ
АО «МНПХ «Фитохимия»	-	Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
БАВ	-	биологически активные вещества
ВАНД	-	временный аналитический нормативный документ
ВР	-	вспомогательные работы
ВЭЖХ	-	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОСТ	-	Государственный стандарт
г	-	грамм
ГФ РК	-	Государственная фармакопея Республики Казахстан
ГХ	-	газовая хроматография
ИК	-	инфракрасная спектроскопия
ЛР	-	лабораторный регламент
ЛРС	-	лекарственное растительное сырье
ЛП	-	лекарственный препарат
ОПР	-	опытно-промышленный регламент
ОФС	-	общая фармакопейная статья
Т	-	время
Система ФСРС	-	Fast Centrifugal Partition Chromatograph (быстрый центробежный хроматограф распределения)
СФЭ	-	сверхкритическая флюидная экстракция
ТО	-	технологическая операция
ТП	-	технологический процесс
УМО	-	упаковка, маркировка, отгрузка
УФ	-	ультрафиолетовая спектроскопия
ЦХР	-	центробежная хроматография распределения
GMP	-	Good Manufacturing Practice (надлежащая производственная практика)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. В настоящее время в фармацевтической отрасли наблюдается активация исследований в области изучения растительного сырья для выявления источников получения биологически активных соединений - флавоноидов, с получением новых субстанций, позволяющих разработать лекарственные средства для медицины и сельского хозяйства.

Перспективным источником многих биологически активных веществ, в том числе флавоноидов, являются растения семейства Ивовых (*Salicaceae*), в частности, рода *Populus* L. (тополь). Препараты тополя бальзамического широко используются при болезнях суставов, как в народной, так и в традиционной медицине. На сегодняшний день, используют настойку тополя бальзамического в виде галеновых препаратов, отличающихся простотой технологии. Потребность в высокоэффективных и малотоксичных растительных препаратах диктует необходимость разработки ускоренных схем научных исследований в области поиска новых средств, обладающих гепатопротекторным, противовоспалительным и антиоксидантным эффектами. В настоящее время на фармацевтическом рынке Республики Казахстан зарегистрировано более 200 наименований дорогостоящих импортных препаратов аналогичного действия. На основе отечественных растительных субстанций, обладающих выраженной гепатопротекторной активностью, разработаны ряд лекарственных средств, таких как салсоколлин, рувимин, лимонидин, биаскин [Адекенов С.М., Кульмагамбетова Э.А. и др.; Арыстанова Т.П., Рахимов К.Д. и др.; Пучкина Л.Н., Жусупова Г.Е., Тулегенова А.У. и др.; М.П. Ирismetов, Ш.К. Айнабаева, А.Б. Шукирбекова]. Несмотря на достижения в этом направлении, активный поиск по созданию новых гепатопротекторных средств продолжается.

В этой связи, исследования по созданию доступного широким слоям населения фитопрепарата и расширение номенклатуры ЛС гепатопротекторного, противовоспалительного, антиоксидантного действия на основе местного, экологически безопасного сырья, содержащего флавоноиды, является актуальной и практически важной проблемой фармацевтической технологии.

Связь темы диссертации с крупными научными программами или основными научно - исследовательскими работами. Диссертационная работа выполнена в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Республика Казахстан в рамках следующих научно-технических программ: НТП (О.0530) «Разработка новых эффективных лекарственных препаратов из растительного сырья и организация их производства по международным стандартам GMP, на 2010-2012 годы» (№ 0110РК00217); НТП О.0570 «Научно-техническое обеспечение новых

технологий переработки лекарственного сырья на 2011-2014 годы» (№ 0110РК00529); НТП О.0676 «Разработка новых фармакологических соединений - субстанций оригинальных лекарственных препаратов и их стандартных образцов» (№ гос. регистрации 0115РК01200) на 2015-2017 годы.

Цель работы: разработка технологии и проведение стандартизации субстанции пиностробина, оксима пиностробина и капсулированной формы оксима пиностробина.

Задачи исследования

1. Оптимизировать способ выделения и очистки флавоноида пиностробина из почек тополя бальзамического с применением сверхкритической флюидной экстракции и современных хроматографических методов с последующим синтезом оксима пиностробина.
2. Подобрать оптимальный состав капсулированной формы с оксимом пиностробина; провести комплекс физико-химических, технологических и биофармацевтических исследований оксима пиностробина в капсулах.
3. Подготовить нормативную документацию на субстанции, лекарственную форму и стандартный образец пиностробина, рекомендуемые к внедрению в медицинскую практику в виде проектов АНД.
4. Разработать опытно-промышленный регламент на производство.
5. Внедрить в производство эффективные, экономичные, экологически безопасные технологии на получение субстанции пиностробина из углекислотного экстракта почек тополя бальзамического с применением современных хроматографических методов и на получение субстанции оксима пиностробина.

Научная новизна полученных результатов

Впервые:

- для выделения и очистки флавоноида пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического использована центробежная хроматография распределения; экспериментально подобраны оптимальные режимы получения углекислотного экстракта из почек тополя бальзамического, выделения из него пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения и синтеза оксима пиностробина, обеспечивающие количественные выходы качественных целевых продуктов;
- подобран оптимальный состав и технология нового лекарственного средства - капсулы оксима пиностробина и определены его биофармацевтические характеристики.
- разработаны спецификации качества и проведена стандартизация субстанции пиностробина, оксима пиностробина и лекарственной формы. Для для включения в Государственную Фармакопею Казахстана подготовлена монография и досье на стандартный образец пиностробина.

Практическая значимость полученных результатов:

- разработаны, апробированы и внедрены в производство технологии получения субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения и проведен синтез оксима пиностробина. Разработанные технологии характеризуются высокой производительностью, сравнительной автоматизацией и значительным сокращением продолжительности технологического процесса, исключением токсичных растворителей;
- разработаны проекты АНД РК на субстанцию пиностробина, оксима пиностробина и капсурованной формы «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы»;
- пиностробин включен в качестве национального стандартного образца в Государственную Фармакопею Республики Казахстан, который предназначен для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ГФ РК, Т. III., 2014);
- на основе лабораторных регламентов разработаны и утверждены опытно-промышленные регламенты на производство субстанции пиностробина (ЛП 40761819-01-14, ОПР 40653870-01-14), субстанции оксима пиностробина (ОПР ФД650050337Р-04-16) и лекарственной формы оксима пиностробина в капсулах (ОПР ФД650050337Р-05-16);
- на базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организован выпуск опытных партий субстанции пиностробина, субстанции оксима пиностробина и лекарственной формы оксима пиностробина 50 мг, капсулы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты по технологии и оценке качества субстанций пиностробина из почек тополя бальзамического с применением сверхкритической флюидной экстракции и современных хроматографических методов, а также данные по проведению синтеза оксима пиностробина.
2. Результаты комплексных технологических, биофармацевтических и фармакокинетических исследований по научно обоснованной разработке состава, технологии препарата оксима пиностробина в капсулах.
3. Нормативные документы АНД на субстанцию пиностробина, оксима пиностробина и на лекарственную форму капсул оксима пиностробина. Стандартный образец на пиностробин, включенный в Государственную Фармакопею Республики Казахстан (ГФ РК, Т. III., 2014).
4. Опытные-промышленные регламенты на производство субстанции пиностробина, оксима пиностробина и лекарственной формы капсул оксима пиностробина.

Личный вклад соискателя заключается в проведении анализа научно-технической и патентной литературы, экспериментальных исследований, выполненных при непосредственном участии соискателя, в разработке

способов и технологий получения промежуточной субстанций пиностробина, оксима пиностробина, лекарственной формы на основе оксима пиностробина в капсулах, опытно-промышленных регламентов, интерпретации и обобщении полученных результатов исследований.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты» (Самара, 2011); «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011); II-ой Международной Казахстанско-Российской конференции по химии и химической технологии (Караганда, 2012); Second International Scientific Conference «Regenerative medicine and healthy aging» (Astana, 2012); «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2013); XIV Российской международной конференции по теплофизическим свойствам веществ (Казань, 2014); «Фармакология экстремальных состояний» (Санкт-Петербург, 2015); I съезде врачей общей практики и семейных врачей Кыргызстана (Бишкек, 2015); Международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития фитохимии» (Караганда, 2015).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.

Основные положения диссертационной работы отражены в 17 печатных работах, из них 7 статей в периодических научных изданиях, индексируемых в системах РИНЦ и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, содержащих - обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложений.

Работа изложена на 136 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 13 рисунками и диаграммами, содержит 19 таблиц, 8 приложений. Библиографический указатель содержит 128 источников русскоязычных и иностранных авторов, включая собственные публикации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, определены цели и задачи исследования, изложены научная новизна, практическая значимость и основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В первой главе - «Флавоноиды – перспективные источники новых лекарственных препаратов», приводятся материалы литературного обзора, обобщающие сведения о препаратах на основе флавоноидов растительного происхождения, обладающих гепатопротекторным, антиоксидантным, противовоспалительным и антимикробным свойствами, технологии их

производства, также возможности применения центробежной хроматографии распределения для выделения и очистки фармакологически активных флавоноидов.

В главе 2 - «Материалы и методы исследования», представлена характеристика предмета и объектов исследования, приведено описание методов исследования.

В качестве материалов использованы: почки тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.); CO₂-экстракт почек тополя бальзамического; субстанция пиностробина; субстанция оксима пиностробина; «Оксим пиностробина 50 мг, капсулы».

Физико-химические и фармацевтические исследования проведены с использованием следующих приборов: потенциометр рН-150 МИ (Россия), аналитические весы «Sartorius» (Германия), набор мерной посуды фирмы «Simax» (Чехия), спектрофотометр «Helios-β» (Великобритания), спектрометр «Termo Nicolet Avatar-360» (США), жидкостный хроматограф Agilent 1100 Series (США), спектрометр «JEOL ECA 500 MHz», «Bruker AM-300», лабораторный экстрактор УСФЭ-5/2, экстракционная установка УЭ-1, быстрый центробежный хроматограф распределения FCPC A200, FCPC 5000, прибор для определения температуры плавления «Voetius» (Германия), установка для получения капсулированных форм марки «JTJ-100А», смеситель V-образный марки «V-20», влажный гранулятор для получения гранул марки HLSG-10, сушильный шкаф полочный марки «СТС-0», тестер для определения распадаемости марки «ERWEKA ZT 504» (Германия).

В экспериментальных исследованиях использованы химические реактивы и растворители квалификации «о.с.ч.», «х.ч.», «ч.д.а.».

Испытание на микробиологическую чистоту субстанций и готовой лекарственной формы в капсулах проводили по методике (ГФ РК, Т.1). Статистическая обработка полученных результатов проведена по методу вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0,95$). Для определения специфичности, линейной зависимости, правильности и воспроизводимости методики количественного анализа активных компонентов в лекарственных препаратах использован метод валидации в соответствии с общими фармакопейными статьями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, ФС, ВФС и других нормативных документов, действующих на территории Республики Казахстан.

В главе 3 - «Разработка технологии субстанции пиностробина и ее стандартизация», определены сырьевые запасы тополя бальзамического, представлены оптимальные условия углекислотной экстракции почек тополя бальзамического для количественного извлечения пиностробина. Подобраны оптимальные условия выделения и очистки субстанции пиностробина с

применением центробежной хроматографии распределения и проведена ее стандартизация.

Тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) сем. Ивовых (*Salicaceae*) распространен в Северной Америки, Канаде и США. Культивируется в России, на Кавказе и Средней Азии. Бальзамический тополь в Казахстане растет повсеместно и является перспективным возобновляемым источником биологически активного флавоноида пиностробина. Основная масса тополя бальзамического расположена в полевых защитных полосах, площадь которых в Казахстане составляет 504,16 тыс. га.

В холдинге «Фитохимия» используется комплексный подход при создании новых эффективных ЛС, включающий: поиск и выбор перспективных растительных объектов, разработку технологий переработки сырья и выделение биологически активных соединений, с последующим созданием на их основе субстанций и лекарственных препаратов. Нами проведена сверхкритическая углекислотная экстракция почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) с изменением технологических параметров. Определены оптимальные условия сверхкритической флюидной экстракции почек тополя бальзамического, при которых достигается оптимальный количественный выход флавоноида пиностробина.

Для экспериментов использовали сырье почек тополя бальзамического собранных в Северо-Казахстанской обл., пос. Прибрежное.

На первом этапе изучения определена зависимость извлечения пиностробина из почек тополя бальзамического от давления (табл. 1), содержание пиностробина в CO₂-экстрактах определяли методом ВЭЖХ.

Как видно из полученных результатов, повышение давления с 10 МПа до 20 МПа при экстрагировании приводит к увеличению выхода CO₂-экстракта и содержания в нем пиностробина. Дальнейшее повышение давления с 20 МПа до 35 МПа в ходе экстракции не оказывает существенного влияния на выход CO₂-экстракта, но приводит к снижению содержания пиностробина в нем.

Таблица 1 - Результаты экспериментов изучения динамики экстрагирования пиностробина из почек тополя бальзамического в зависимости от давления

№ эксперимента	Параметры экстрагирования			Выход экстракта		Содержание пиностробина	
	давление, МПа	время, мин	T, °C	г	%	г	%
1	10	180	60	5,4	2,7	0,85	15,66
2	15	180	60	12,7	6,35	2,14	16,87
3	20	180	60	33,2	16,60	8,32	25,10
4	25	180	60	33,0	16,50	7,50	22,73
5	30	180	60	32,8	16,40	6,90	21,04
6	35	180	60	32,6	16,30	6,32	19,38

В ходе проведенного эксперимента установлено, что количественное извлечение пиностробина из почек тополя бальзамического (91,0 %) наблюдается при давлении 20 МПа, при этом выход CO₂-экстракта составляет 16,6 % с содержанием пиностробина 25,10 %.

На следующем этапе подбора оптимального режима определена продолжительность проведения экстракции (табл. 2).

В результате установлено, что количественное извлечение пиностробина из почек тополя бальзамического - 91,0 %, обеспечивает экстракция сырья в течение 180 минут, при этом выход CO₂-экстракта составляет 13,5 % с содержанием пиностробина 29,6 %.

Таблица 2 - Результаты изучения выхода экстракта и пиностробина из почек тополя бальзамического в зависимости от времени экстракции

№ экспери-мента	Параметры экстрагирования			Выход экстракта		Содержание пиностробина	
	давление, МПа	Т, °С	время, мин	г	%	г	%
1	20	60	90	35,0	3,5	10,0	28,6
2	20	60	120	37,6	3,8	11,4	30,2
3	20	60	150	40,4	4,0	12,5	31,0
4	20	60	180	45,6	4,6	13,5	29,6
5	20	60	210	46,0	4,6	13,5	29,4
6	20	60	240	46,1	4,6	13,5	29,3

Как показывают результаты экстракции сырья почек тополя бальзамического в зависимости от продолжительности процесса, наиболее оптимальным давлением при экспериментальном исследовании, является 180 минут, способствующий увеличению выхода экстракта и извлечению содержания пиностробина в нем до 29,6%.

Для выяснения влияния фактора температуры на количественный выход экстракта и действующего вещества пиностробина проведено следующее исследование, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Динамика выхода экстракта и пиностробина в зависимости от температуры экстракции

№ экспери-мента	Параметры экстрагирования			Выход экстракта		Содержание пиностробина	
	давление, МПа	Т, °С	время, мин	г	%	г	%
1	20	50	180	26,0	2,6	6,3	24,0
2	20	55	180	35,6	3,3	8,9	27,2
3	20	60	180	38,8	3,9	12,0	30,9
4	20	65	180	45,6	4,6	13,8	30,2
5	20	70	180	45,9	4,6	13,6	29,7

Таким образом, в результате проведенной работы определены оптимальные параметры режима экстракции почек тополя бальзамического с использованием CO₂-газа в сверхкритическом состоянии, обеспечивающие количественное извлечение пиностробина (табл. 4).

Таблица 4 - Оптимальный режим CO₂-экстракции почек тополя бальзамического, обеспечивающий количественное извлечение пиностробина

Режим экстракции			Выход CO ₂ -экстракта и количественное содержание пиностробина						
Давление, МПа	Т, °С	время, мин.	полнота извлечения пиностробина, %	выход экстракта		содержание пиностробина в экстракте		остаточное содержание пиностробина в шроте	
				г	%	г	%	г	%
20	60	180	91,0	33,2	16,60	8,32	25,10	0,81	0,41

Таким образом, в результате проведенной экспериментальной работы определены оптимальные параметры процесса экстрагирования сырья почек тополя бальзамического с применением сверхкритической углекислотной экстракции, обеспечивающие количественное извлечение пиностробина из растительного сырья.

Традиционная технология выделения пиностробина из экстракта почек тополя бальзамического заключалась в хроматографическом разделении экстракта методом колоночной хроматографии на силикагеле, а в качестве элюента использовался дорогостоящий и огнеопасный петролейный эфир. При этом, наработка 60 г пиностробина составляла порядка 10 рабочих дней. Поэтому разработка нового способа выделения пиностробина из экстракта почек тополя бальзамического с применением современного хроматографического метода – центробежной хроматографии распределения, является актуальной задачей.

Для разработки эффективного и экологически безопасного способа препаративной наработки пиностробина нами впервые проведена апробация современных хроматографических методов, а именно центробежной хроматографии распределения.

Поскольку основой успешного разделения с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) является правильный выбор хроматографической системы растворителей, работа была начата с подбора оптимальной системы растворителей, которые обеспечат количественные выходы качественного целевого продукта.

Изначально проведен подбор системы растворителей для разделения на установке FCPC-A200 CO₂-экстракта почек тополя бальзамического, при этом использовались следующие смеси растворителей:

- 1) гептан : этилацетат:ацетонитрил (2:1:2);
- 2) гептан : этилацетат:ацетонитрил (4:1:4);
- 3) гептан : этилацетат:ацетонитрил:вода (4:1:4:1);

- 4) гептан : этилацетат:ацетонитрил:вода (6:1:6:1);
- 5) гептан : этилацетат:ацетонитрил:вода (2:1:2:1);
- 6) гексан : этилацетат:ацетонитрил:вода (6:4:5:4).

Двухфазная система для разделения CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического подобрана согласно коэффициенту распределения (К) пиностробина между двумя не смешивающимися фазами. Значение К пиностробина оценивали по анализу методом ВЭЖХ. Оптимальной системой растворителей для выделения пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического определена смесь гексан : этилацетат : ацетонитрил : вода (6:4:5:4), в качестве подвижной фазы использован нижний слой системы.

В результате проведенных работ установлено, что центробежная хроматография распределения является более эффективным способом для выделения и очистки пиностробина, по сравнению с колоночной хроматографией, т.к. производительность труда повышается в 2,5 раз, выход продукта (в пересчете на массу экстракта) повышается в 1,03 раза, затраты на растворители снижаются в 2,7 раза.

Таким образом, на основании полученных данных впервые разработан способ выделения и очистки флавоноида пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического с применением центробежной хроматографии распределения.

Выделение пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического проводится в два этапа: очистка с применением производственной установки FCPC-5000 (быстрый центробежный хроматограф распределения) и последующей перекристаллизацией технического пиностробина.

Для выполнения первого этапа очистки изучено влияние ряда технологических факторов, влияющих на выход целевого продукта, а именно, массы и растворителя вводимой пробы, скорости подачи подвижной фазы и вращения ротора (рис. 1-4).

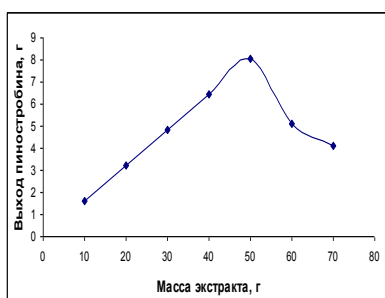


Рис. 1. Зависимость выхода пиностробина от массы вводимой пробы.

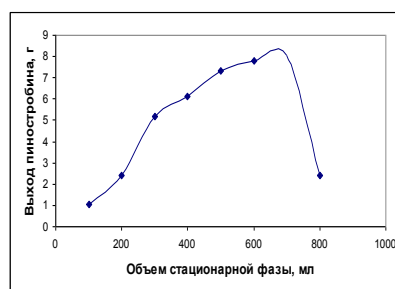


Рис. 2. Зависимость выхода пиностробина от объема стационарной фазы в пробе.

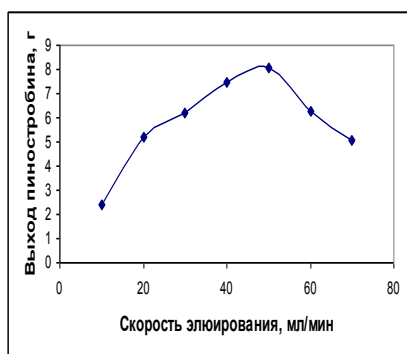


Рис. 3. Зависимость выхода пиностробина от скорости подачи подвижной фазы.

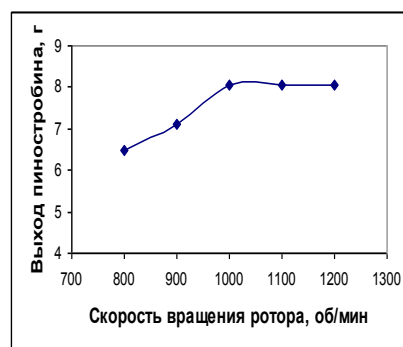


Рис. 4. Зависимость выхода пиностробина от скорости вращения ротора установки ФСРС-5000.

Экспериментально установлено, что для выделения пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического оптимальными являются следующие условия: 50,0 г CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического растворяют в 700 мл подвижной и 100 мл стационарной фазы при тщательном перемешивании, разделение проводится при скорости подачи элюента 50 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 об/мин, УФ-детектирование при 289 нм. Полное разделение вводимой пробы происходит в течение 90 минут.

Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, согласно полученной хроматограмме разделения CO_2 -экстракта. Элюент отгоняют на роторном испарителе и возвращают в цикл с минимальными потерями.

В результате разделения получают 4 фракции объемом от 250 до 1000 мл, растворитель упаривают, получают пиностробин технический с содержанием целевого продукта более 97 %.

Второй этап очистки включает в себя перекристаллизацию пиностробина из гексана. Выход пиностробина с чистотой не менее 99,0 % составляет 16,0 % в пересчете на массу CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического.

Таким образом, разработана эффективная, экономичная и экологически безопасная технология получения субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения, позволяющая нарабатывать в сутки до 40 г пиностробина с чистотой не менее 99,0 %.

На основании проведенных исследований, с учетом оптимальных параметров выделения пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического с применением центробежной хроматографии распределения, разработаны лабораторный и опытно-промышленный регламент на получение субстанции пиностробина. Разработан проект АНД на субстанцию пиностробина, который составлен на основании результатов анализов 3 серий опытно-промышленной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК. Результаты исследований физико-химических характеристик субстанции пиностробина приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели качества субстанции пиностробина

Наименование показателей	По проекту АНД	Результаты		
		010515	020515	030515
1	2	3	4	5
Описание	Кристаллический порошок белого цвета	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Растворимость	Растворим в хлороформе, эфире диэтиловом, этилацетате, ацетоне, мало растворим в 96 % этаноле, практически не растворим в воде.	Соответствует	Соответствует	Соответствует
1	2	3	4	5
Подлинность	В области от 4000 см ⁻¹ до 500 см ⁻¹ должен иметь полосы поглощения при 3091, 3057 (С-Н связи ароматических групп), 2934 (О-СН ₃ при ароматической группе), 1650 (С=О), 1622, 1574 (С=C), 1343 (-СН ₃), 1317, 1255, 1155 (С-О-С), 1283, 1095, 890 см ⁻¹ (бензольное кольцо). Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.0005 % раствора образца в 95 % спирте этиловом в области от 190 до 450 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (289±2) нм и при 325±2 нм.	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Качественная реакция на флавоноиды	К 0.1 г образца прибавляют 1 мл 95 % спирта этилового, 0.5 мл кислоты хлороводородной концентрированной и 0.1 г порошка магния металлического, появляется розовато-красное окрашивание.	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Температура плавления, °С	От 97 до 99	97 - 98	97 - 99	96 - 97
Потеря в массе при высушивании, %	Не более 0,5	0,35	0,42	0,31
Родственные примеси	Не более 1,0 %	0,31	0,35	0,27
Количественное определение	Не менее 97,0 %	99,20	99,20	99,30
Остаточные растворители	Не более 0,5 %	0,03	0,02	0,03
Срок хранения	2 года	Соответствует	Соответствует	Соответствует

Таким образом, разработан проект АНД на пиностробин – стандартный образец. Пиностробин включен в Государственную Фармакопею Республики Казахстан в качестве национального стандартного образца ГФ РК, который

предназначен для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и препаратах.

Глава 4 - «Разработка технологии получения субстанции оксима пиностробина» посвящена подбору оптимальных условий оксимирования пиностробина, а также оценки качества полученной субстанции оксима пиностробина.

Взаимодействием пиностробина (1) с гидроксиламином в этиловом спирте с добавлением натрия гидрокарбоната получают оксим пиностробина (2) (рис.5), который обладает выраженным гепатопротекторным действием, преобладающим над аналогичной активностью пиностробина и суммы экстрактивных веществ почек тополя бальзамического.

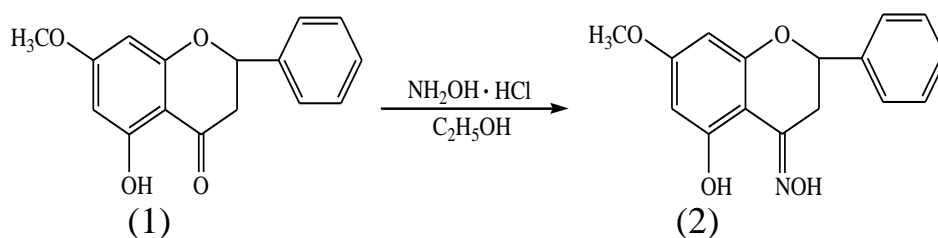


Рис. 5. Химическая схема производства субстанции оксима пиностробина.

Произведен подбор оптимальных условий для проведения синтеза оксима пиностробина, который обеспечит количественный выход качественного целевого продукта. В ходе экспериментов варьировали соотношение пиностробина, растворителя этанола, реагентов, а также изменяли время синтеза. Зависимость количественного выхода оксима пиностробина от условий проведения реакций представлена в табл. 6.

Таблица 6 – Зависимость выхода оксима пиностробина от условий синтеза при температуре 60 оС (количество пиностробина – 30 г)

Объем этанола, мл	Гидроксиламин солянокислый, г	Натрия гидрокарбонат, г	Т синтеза, ч	Выход оксима пиностробина, %
500	11,55	15,01	24	17,9 (56)
500	11,55	15,00	48	23,0 (72)
300	15,01	15,02	24	26,6 (83)
250	15,00	15,01	72	31,4 (98)

Таким образом, нами подобраны условия проведения оксимирования пиностробина в этаноле (температура 60°С, продолжительность 72 часа, избыточное количество реагента гидроксиламина солянокислого), обеспечивающие выход 98 % с чистотой продукта не менее 99 %.

На основании результатов анализов 3-х серий разработан проект АНД на субстанцию оксима пиностробина, который составлен в соответствии с требованиями ГФ РК. Результаты исследования показателей качества субстанции оксима пиностробина представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Показатели качества субстанции оксима пиностробина

Наименование показателей	По проекту АНД	Результаты		
		011115	021115	031115
Описание	Кристаллический порошок от белого до белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Растворимость	Растворим 95 % спирте, этилацетате, ацетоне, практически не растворим в воде	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	В области от 4000 см ⁻¹ до 500 см ⁻¹ должен иметь полосы поглощения при 3436 (N-OH), 3007, 2983, 2916, 2848, 1646, 1616, 1577, 1442, 1351, 1338, 1295, 1226, 1191, 1153, 1093, 1029, 886, 704, 651, 640, 539, 464. В области от 190 нм до 400 нм	Соответствует	Соответствует	Соответствует
1	2	3	4	5
	должен иметь максимумы поглощения при длинах волн 280±2 нм.			
Качественная реакция на флавоноиды	Должно проявиться красное окрашивание	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Температура плавления, °С	От 182°С до 184	181-183	182-183	181-183
Количественное определение, %	Не менее 97,0	99,10	99,20	99,40
Посторонние примеси, %	Не более 3,0	1,55	1,24	1,18
Потеря в массе при высушивании, %	Не более 0,5	0,38	0,34	0,43
Микробиологическая чистота	Общее число грибов не более 100	Соответствует	Соответствует	Соответствует

Разработана методика количественного определения содержания оксима пиностробина в субстанции пиностробина методом ВЭЖХ и доказана ее валидность. По результатам исследования разработана спецификация качества субстанции оксима пиностробина. Разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции оксима пиностробина (ОПР ФД650050337Р-04-16).

В главе 5 - «Разработка технологии и стандартизация капсулированной формы оксима пиностробина» представлен состав и технология капсулированной формы на основе оксима пиностробина и ее стандартизация. Приведены исследования технологических свойств субстанции и модельных смесей капсул оксима пиностробина; обоснована

технология изготовления на их основе гранул для наполнения капсул; разработаны технологические операции их изготовления.

В отечественной и зарубежной практике при разработке ЛП определяющее значение имеет выбор рациональной подобранной формы. Лекарственная форма является основной структурной единицей современной фармакотерапии, и ей по праву отводится первостепенная роль. Общеизвестно, что скорость и продолжительность терапевтического действия ЛП зависят не только от его химической и физиологической активности, а также от степени дисперсности, природы вспомогательных веществ, технологии изготовления, вида лекарственной формы и пути введения ЛП.

Для разработки технологии, позволяющей получить капсулы с оксимом пиностробина, подобран состав трех модельных композиции (табл. 8).

Таблица 8 - Состав модельных смесей с оксимом пиностробина

Наименование ингредиентов	Количество ингредиентов модели на 1 капсулу, г		
	1	2	3
Оксим пиностробина	0,0500	0,0500	0,0500
Лактоза	0,0510	0,1086	-
Магния карбонат основной	-	-	0,1046
Крахмал	0,0410	-	0,0310
Поливинилпирролидон	0,0080	0,0170	-
Полоксамер Kolliphor P188 micro	0,0308	-	0,0124
Натрия альгинат	-	0,0042	-
Кальция стеарат	0,0002	0,0002	0,0020
Натрия лаурилсульфат	0,020	0,020	-
Вода очищенная	-	q.s.	q.s.
Спирт этиловый	q.s.	q.s.	-
Итого	0,2000	0,2000	0,2000

Использованы биологически индифферентные вспомогательные вещества: наполнители - лактоза, магния карбонат основной, крахмал, позволяющие регулировать объемную плотность и придавать необходимую сыпучесть; скользящий ингредиент кальция стеарат; связующее вещество - повидон, полксамер для улучшения растворения труднорастворимых субстанций, а в качестве солюбилизатора применили натрия лаурилсульфат.

Для приготовления гранул смешивали измельченные и просеянные вспомогательные вещества и действующее вещество оксим пиностробина. Смешивание производили в смесителе «V-образном» марки «V-20», куда загружали сразу все компоненты, процесс перемешивания составлял 45 минут. Подготовленную смесь разместили во влажный гранулятор марки HLSG-10 для получения влажных гранул. Процесс увлажнения проводили с применением связующего раствора пласдона с добавлением солюбилизатора натрия лаурилсульфата. Полученные влажные массы пропустили через сухой

гранулятор для формирования гранул и поставили сушить в полочный сушильный шкаф марки «СТС-0». Сушку влажных гранул проводили при температуре $(50 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. Высушенные гранулы просеивали через сито с диаметром пор 1 мм, опудривали кальция стеаратом.

Определены технологические параметры гранул оксима пиностробина: насыпная плотность, сыпучесть и потери массы при высушивании. Насыпную плотность порошка измеряли на приборе модели 545 Р-АК-3. Сыпучесть гранулята устанавливали с использованием виброустройства марки ВП - 12А (табл. 9).

Таблица 9 - Технологические параметры гранул оксима пиностробина

№ модельной смеси	Насыпная плотность, г/мл	Сыпучесть, г/с	Потеря массы при высушивании, %
1	0,595	3,026	1,8
2	0,643	3,690	2,2
3	0,402	0,759	1,0

Проведенные исследования показали, что оптимальными по технологическим свойствам являются гранулы оксима пиностробина модели №1, обладающие хорошей насыпной плотностью и сыпучестью.

Затем провели процесс капсулирования на установке марки «JTJ-100А», используя желудочно - растворимые капсулы № 2.

Для оценки качества капсул провели изучение ряда фармацевтических параметров по разработанной нами спецификации качества капсул оксима пиностробина. Фармацевтические параметры определяли в соответствии с требованиями ГФ РК. По результатам анализа 3-х серий опытных образцов капсул оксима пиностробина провели определение показателя распадаемости полученных капсул. Результаты исследования оценки качества капсул оксима пиностробина в дозе 50 мг представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Показатели качества капсул оксима пиностробина 50 мг

№ модельной смеси	$m_{\text{ср}}$, мг	$-\Delta m$, %	$+\Delta m$, %	Распадаемость, мин	Однородность дозирования	Содержание оксима пиностробина, мг
1	197,9	1,16	3,28	Соответствует	Соответствует	49,4
2	196,4	1,75	3,31	Соответствует	Соответствует	49,0
3	197,9	2,68	3,64	Соответствует	Соответствует	50,4

По результатам технологических и фармакологических исследований для капсулирования гранул оксима пиностробина выбрана желудочно-растворимая капсула, соответствующая размеру №2.

Изучение кинетики высвобождения действующего вещества из капсул с оксимом пиностробина проведено на приборе «вращающаяся корзинка»

фирмы «ERWEKA ZT 504» (Германия). Содержание оксима пиностробина в пробах определяли методом ВЭЖХ по разработанной нами методике.

Для проведения анализа по тесту «Растворение» подобраны экспериментальные условия: среда – 0,1 М кислота хлороводородная (ГФ РК, т. 2, с. 60), объем среды - 500 мл, скорость вращения – 75 об/мин, время растворения 60 мин. По результатам исследований высвобождение оксима пиностробина из капсул за 45 минут составляет 86%, при значении рН 0,1М кислоты хлороводородной.

Таким образом, результаты теста «Растворения» свидетельствовали о высокой потенциальной биодоступности оксима пиностробина в капсулах.

По полученным параметрам можно сделать заключение о хорошей воспроизводимости данной методики. Достоверность данной методики установлена по результатам анализа растворов с использованием стандартного образца оксима пиностробина.

С учетом физико-химических свойств и в соответствии с требованиями нормативных документов, разработана спецификация качества опытных образцов капсул оксима пиностробина 50 мг. Проведена стандартизация в 5 сериях опытно-промышленного выпуска капсул оксима пиностробина согласно спецификации качества и разработан проект АНД.

На основе лабораторного регламента разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство капсул оксима пиностробина 50 мг (ОПР ФД65005037Р-05-16).

На базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» апробированы и внедрены в производство эффективные, экономичные и экологически безопасные технологии получения субстанций пиностробина, оксима пиностробина. Организован выпуск опытно-промышленных партий капсулированной формы «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы», для проведения клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные параметры режима экстракции почек тополя бальзамического с использованием CO_2 -газа в сверхкритическом состоянии, обеспечивающие количественное извлечение пиностробина.
2. Впервые для выделения и очистки флавоноида пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического использована центробежная хроматография распределения. Экспериментально подобраны оптимальные режимы выделения пиностробина из углекислотного экстракта почек тополя бальзамического с применением центробежной хроматографии распределения, и синтеза оксима пиностробина, обеспечивающие количественные выходы качественных целевых продуктов.
3. Впервые разработан оптимальный состав и технология нового лекарственного средства - капсулы оксима пиностробина и определены его биофармацевтические характеристики.

4. На базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организован выпуск субстанции пиностробина, оксима пиностробина, а также опытных партий лекарственного средства оксима пиностробина 50 мг, капсулы.
5. Разработаны и утверждены нормативные документы в виде проектов на субстанции пиностробина, оксима пиностробина и на лекарственную форму оксима пиностробина. На основе лабораторных регламентов разработаны опытно-промышленные регламенты на производство субстанции пиностробина (ЛП 40761819-01-14, ОПР 40653870-01-14), оксима пиностробина (ОПР ФД650050337Р-04-16) и капсулированной формы оксима пиностробина 50 мг (ОПР ФД650050337Р-05-16). Пиностробин включен в качестве стандартного образца в Государственную Фармакопею Республики Казахстан (ГФ РК, Т. III, 2014).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жанымханова П.Ж.**, Тихонова Е.В., Смагулов А.М., Итжанова Х.И., Поляков В.В., Адекенов С.М. Сублимационная сушка субстанции липосомального оксима пиностробина // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. - Санкт-Петербург, 2010. – Т.1. – С. 229-231.
2. **Жанымханова П.Ж.**, Тихонова Е.В., Адекенова А.С., Поляков В.В., Адекенов С.М. Оценка критериев качества капсул пиностробина оксима липосомального // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. - Пятигорск, 2011. Вып. 66. - С. 325-326.
3. **Жанымханова П.Ж.**, Тихонова Е.В., Итжанова Х.И., Поляков В.В., Адекенов С.М. Влияние вспомогательных веществ на технологические характеристики модельных смесей липосомальных субстанций оксима пиностробина // Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты. – Самара, 2011. – С. 176-177.
4. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г. К., Куанбаев А.А., Адекенова А.С., Адекенов С.М. Разработка технологических параметров получения и контроль качества густого экстракта почек тополя бальзамического // Фармацевтический бюллетень. - Караганда, 2012. -№ 4-6. - С. 60-63.
5. **Жанымханова П.Ж.**, Куанбаев А.А, Исина О.Ж., Адекенова А.С., Поляков В.В., Рахимова Б.Б. Разработка технологии получения оксима пиностробина // Материалы II-ой Международной Казахстанско-Российской конференции по химии и химической технологии. – Караганда, 2012. -Т.2. - С. 337-338.
6. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К. Лекарственные препараты на основе природных флавоноидов // Фармацевтический бюллетень. – Караганда, 2014. -№ 1-2. - С. 5-21.
7. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К., Турысбаева А.Ш., Богоявленский А.П., Адекенов С.М. Изучение противовирусной активности некоторых

- производных гидразона пиностробина // Фармация и фармакология. - Пятигорск, 2014. - № 6 (7), – С. 92-95.
8. **Жанымханова П.Ж.**, Тихонова Е.В., Поляков В.В., Адекенов С.М. Получение липосомальных лекарственных веществ // XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. - Волгоград, 2011. –Т. 2. - С. 192.
 9. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К., Шульц Э.Э., Дуйсенбаев Н.К., Адекенов С.М. Новые модифицированные производные на основе флавоноида пиностробина // Химия, структура и функция биомолекул. – Минск, 2014. – С. 135.
 10. **Жанымханова П.Ж.** Технология получения субстанции оксима пиностробина и его стандартизация // Вестник КГМА. - Бишкек. 2015. -№ 2. - С. 163-168.
 11. **Жанымханова П.Ж.** Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.), произрастающего на территории Казахстана и его стандартизация // Вестник КГМА. - Бишкек. 2015. - № 2. - С. 159-162.
 12. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К., Турысбаева А.Ш., Покровский М.А., Шульц.Э.Э., Адекенов С.М. Синтез и цитотоксическая активность производных гидразона пиностробина // Химия природных соединений. - Ташкент, 2015. - № 3. - С. 404-410.
 13. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К., Липеева А.В., Шульц Э.Э., Гатилов Ю.В., Шакиров М.М, Адекенов С.М. Флаванон пиностробин в синтезе кумаринохалконовых гибридов с триазольным линкером // Химия гетероциклических соединений. - Рига, 2015. - № 52 (2), - С. 46-152.
 14. **Жанымханова П.Ж.**, Мукушева Г.К., Арыстан Л.И., Ли Е.А., Сариев А.К., Адекенов С.М. Фармакологические свойства оксима пиностробина // Фармакология экстремальных состояний. - Санкт-Петербург, 2015. –Т.13. - С.112-113.
 15. **Zhanymkhanova P. Zh.**, Zabaeva A.N., Orazbayeva P.Z., Itzhanova K.H., Mukusheva G.K., Adekenov S.M. Development of technology of capsules oxime of pinostrobin 50 mg // Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry. – Karaganda, 2015. – P. 201.
 16. **Zhanymkhanova P.Zh.**, Itzhanova K.H., Mukusheva G.K., Adekenov S.M. The transdermal medical system with pinostrobin oxime // Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry. – Karaganda, 2015. – P. 197.
 17. **Zhanymkhanova P.Zh.**, Toregozhina Z.R., Orazbayeva P.Z., Adekenova A.S., Tuleuova G.H., Adekenov S.M. Standartization oxime of pinostrobin // Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry. – Karaganda, 2015. – P. 186.

РЕЗЮМЕ

диссертации **Жанымхановой Пернеш Жайдарбековны** на тему «Технология лекарственного средства гепатопротекторного действия на основе оксима пиностробина и его стандартизация» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности **14.04.01 - технология получения лекарств**

Ключевые слова: почки тополя бальзамического, субстанция, пиностробин, оксим пиностробина, капсулы.

Объекты исследования: почки тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.); СО₂-экстракт почек тополя бальзамического; субстанция пиностробина; субстанция оксима пиностробина, капсулированная форма оксима пиностробина.

Цель работы. Разработка технологии и проведение стандартизации субстанций пиностробина, оксима пиностробина и капсулированной формы оксима пиностробина.

Методы исследования: физико-химические: углекислотная экстракция, центробежная хроматография распределения, высокоэффективная жидкостная хроматография; статистические методы.

Результаты исследования. Разработаны, апробированы и внедрены в производство технологии получения субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения и проведен синтез оксима пиностробина. Подобран оптимальный состав и технология нового лекарственного средства - капсулы оксима пиностробина.

Разработаны проекты АНД РК и утверждены опытно-промышленные регламенты на субстанции пиностробина, оксима пиностробина и капсулированной формы оксима пиностробина.

На Карагандинском фармацевтическом заводе внедрена в производство технология получения субстанции пиностробина, оксима пиностробина, лекарственной формы оксима пиностробина.

Научная новизна. Впервые для выделения и очистки флавоноида пиностробина из СО₂-экстракта почек тополя бальзамического использована центробежная хроматография распределения и проведен синтез на его основе, обеспечивающие количественные выходы качественных целевых продуктов.

Разработан оптимальный состав и технология нового лекарственного средства - капсулы оксима пиностробина и определены его биофармацевтические характеристики.

Разработаны спецификации качества и проведена стандартизация субстанции пиностробина, оксима пиностробина и лекарственной формы. Для включения в Государственную Фармакопею Казахстана подготовлена монография и досье на стандартный образец пиностробина.

Область применения: фармация, технология лекарств.

