

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ
РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени И.К. АХУНБАЕВА**

ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ НАН КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

**На правах рукописи
УДК 615.32:615.412.5:615.45**

ЖАНЫМХАНОВА ПЕРНЕСИ ЖАЙДАРБЕКОВНА

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

14.04.01- технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Бишкек - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | стр. |
|--|------|
| НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ | 4 |
| ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| 1 ФЛАВОНОИДЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ | 12 |
| 1.1 Лекарственные препараты на основе биологически активных флавоноидов | 12 |
| 1.2 Применение центробежной хроматографии распределения для выделения и очистки флавоноидов | 30 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 39 |
| 2.1 Материалы исследования | 39 |
| 2.2 Методы исследования | 41 |
| 3 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУБСТАНЦИИ ПИНОСТРОБИНА И ЕЕ СТАНДАРТИЗАЦИЯ | 45 |
| 3.1 Определение сырьевых запасов тополя бальзамического | 45 |
| 3.2 Подбор оптимальных условий углекислотной экстракции почек тополя бальзамического для количественного извлечения пиностробина | 45 |
| 3.3 Разработка нового способа выделения и очистки пиностробина из СО ₂ -экстракта почек тополя бальзамического с применением современных хроматографических методов | 50 |
| 3.4 Разработка технологии субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения | 53 |
| 3.4.1 Подбор оптимальных условий выделения и очистки субстанции пиностробина | 53 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.5. | Спецификация качества субстанции пиностробина | 59 |
| 3.6. | Разработка опытно-промышленного регламента получения субстанции пиностробина | 66 |
| 4 | РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУБСТАНЦИИ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА | |
| 4.1 | Подбор оптимальных условий оксимирования пиностробина | 76 |
| 4.2 | Оценка качества субстанции оксима пиностробина | 78 |
| 4.3 | Разработка опытно-промышленного регламента получения субстанции оксима пиностробина | 84 |
| 5 | РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ КАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА | |
| 5.1 | Разработка состава и технологии капсулированной формы на основе оксима пиностробина | 89 |
| 5.2 | Оценка качества капсулированной формы оксима пиностробина 50 мг. | 95 |
| 5.3 | Разработка технологии опытно-промышленного регламента на получения капсул оксима пиностробина 50 мг | 97 |
| 5.4 | Биофармацевтическое исследование капсулированной формы оксима пиностробина. Исследование абсолютной биодоступности капсул оксима пиностробина | 106 |
| | ВЫВОДЫ | 111 |
| | ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 112 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 113 |
| | ПРИЛОЖЕНИЯ | 127 |

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

- Инструкция по оформлению диссертации и автореферата. ВАК, Бишкек, 2011, 23 с.;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Жибек жолы, - 2008. – Т.1. – 592 с.;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Жибек жолы, - 2008. – Т.2. – 804 с.;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Жибек жолы, - 2014. – Т.3. – 872 с.;
- Государственная фармакопея СССР XI. – Медицина, - 1987. – вып. 1. - 336 с.;
- Государственная фармакопея СССР XI. – Медицина, - 1987. – вып. 2. - 400 с.;
- ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
- ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин;
- ГОСТ 137-67. Реактивы. Этанол, чда;
- ГОСТ 22300-76. Реактивы. Этиловый эфир уксусной кислоты, чда;
- ГОСТ 5556-81. Вата медицинская гигроскопическая хирургическая хлопковая нестерильная;
- ГОСТ 7584-77. Бумага лабораторная фильтровальная;
- ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

| | |
|---------------------------|--|
| АНД - | Аналитический нормативный документ |
| АО «МНПХ «Фитохимия» - | Акционерное общество «Международный научно- производственный холдинг «Фитохимия» |
| 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 - | спектроскопия - инфракрасная спектроскопия |
| КХ – | колоночная хроматография |
| ЛР – | лабораторный регламент |
| ЛРС – | лекарственное растительное сырье |
| ОПР – | Опытно-промышленный регламент |
| ОФС – | общая фармакопейная статья |
| Система FCPC - | - 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). |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

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. В плане разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых оригинальных высокоэффективных фитопрепаратов перспективным объектом является тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) – вид лиственных деревьев из рода тополь (*Populus*) семейства Ивовые (*Salicaceae*). В культуре широко распространено в Европейской части России, а также в Западной Европе и Азии, в Казахстане встречается в городских посадках в Караганде и Семипалатинске. 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 и не требующих углубленных исследований. 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. На сегодняшний день 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 [1-4] 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 лекарственных средств 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» 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), НИР «Развитие нанонауки и нанотехнологий в Республике Казахстан на 2010-2012 годы» по теме: «Гепатопротекторная липосомальная лекарственная форма оксима пиностробина направленного действия» (№ 0110РК00480), 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 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 «Оксим 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

Автор принимала непосредственное участие во всех этапах выполнения диссертационной работы: анализа научно-технической и патентной литературы, экспериментальных исследований, в разработке способов и технологий получения промежуточной субстанций пиностробина, оксима пиностробина, лекарственной формы на основе оксима пиностробина в капсулах, опытных-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); на 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); на XIV Российской международной конференции по теплофизическим свойствам веществ (Казань, 2014); «Фармакология экстремальных состояний» (Санкт-Петербург, 2015); на I съезде врачей общей практики и семейных врачей Кыргызстана «Вестник» (Бишкек, 2015), Международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития фитохимии» (Караганда, 2015), «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях

Основные положения диссертационной работы отражены в 17 печатных работах, из них 7 статей в периодических научных изданиях и тезисы 8 докладов, 2 монопубликации.

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 таблицы, 8 приложения. Библиографический указатель содержит 128 источник русскоязычных и иностранных авторов, включая собственные публикации.

ГЛАВА 1

ФЛАВОНОИДЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (обзор литературы)

1.1 Лекарственные препараты на основе биологически активных флавоноидов

В связи с широким спектром биологической активности одной из популярных моделей изучения структура-активность являются продукты вторичного метаболизма растений – флавоноиды.

Флавоноиды - уникальный класс биологически активных соединений (БАС), обладающих низкой токсичностью и разнообразными биологическими свойствами. Лекарственные средства флавоноидной природы с успехом применяют в качестве антиоксидантов, ангио- и гепатопротекторов. Это дает основание рассматривать флавоноиды в качестве веществ, наиболее перспективных для создания высокоэффективных полифункциональных лекарственных препаратов.

Интерес к фенольным соединениям вообще и к их биологическому действию, в частности, вызван широким, практически всеобщим, распространением в растительном и животном мире, наличием у этого класса веществ с достаточно высокой и разнообразной химической, биохимической и физиологической активностью. По мере выделения, очистки, изучения фенольных соединений, стало возможным их использование и в качестве фармакологических средств.

Поражения печени различной этиологии являются достаточно широко распространенной патологией. По данным ВОЗ в мире – 2 миллиарда человек

с патологией печени, что в 100 раз превышает распространенность ВИЧ-инфекции [5]. Среди широкого круга препаратов, используемых в комплексной терапии заболеваний печени, выделяют сравнительно небольшую группу «истинных» гепатопротекторов, эффективность которых не всегда оказывается достаточной.

В патогенезе поражений печени (токсической, алкогольной и другой этиологии) большое значение отводится окислительному стрессу [6]. При оксидативном стрессе, в первую очередь, наблюдается сдвиг про-антиоксидантного равновесия в сторону усиления прооксидантной составляющей, снижение резервов мобилизации антиоксидантной защиты, что сопряжено с нарушением энергообеспечения клетки, детоксикационных механизмов, активацией апоптоза, провоспалительных цитокинов и др. [7].

Окислительный стресс инициирует нарушения, связанные с кровоснабжением печени (повреждение эндотелия сосудов и синусоидов печени с изменением выработки оксида азота, ухудшение реологических свойств крови, состояния микроциркуляторного русла и пр), что усугубляет течение патологического процесса [8].

Многофакторность патогенеза поражений печени требует, чтобы и защита осуществлялась на различных уровнях и структурах, что определяет перспективность поиска новых гепатопротекторов среди флавоноидов, для которых выявлено более 40 видов фармакологической активности [9]. Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению гепатозащитных свойств флавоноидов, сравнительного изучения эффективности их действия не проводилось. Не выяснены до конца и механизмы их гепатопротекторной активности. Большинство исследователей считают, что основой такового является антиоксидантное действие [10].

Поэтому сегодня актуальным является поиск новых эффективных и безопасных гепатозащитных препаратов. Растительные экстракты всегда привлекали внимание исследователей в качестве эффективных и безопасных субстанций для получения лекарственных средств. За последнее время

интерес к изучению натуральных растительных экстрактов возрос благодаря антиоксидантным свойствам, которые проявляют многие из них, содержащие полифенольные соединения [11].

Многочисленными работами показано влияние полифенолов на биохимические процессы, протекающие в растительном и животном организмах [12-13]. Опытами *in vitro* было показано, что ингибиторы - антиоксиданты обладают способностью подавлять окислительно-восстановительные процессы в раковых клетках (биологическое окисление и гликолиз), уменьшать в них содержание РНК, угнетать биосинтез белка. Некоторые из этих эффектов могут быть объяснены действием свободных радикалов, образующихся в результате превращения ингибиторов в клеточном субстрате.

Рядом работ продемонстрировано влияние полифенольных ингибиторов свободно-радикальных процессов на важнейшие биохимические процессы дыхания и гликолиза [14]. Известно, что полифенолы обладают сосудоукрепляющим действием, влияют на ЦНС, эндокринную систему, повышая сопротивляемость организма ко всякого рода вредным воздействиям. В малых дозах фенолы улучшают репаративную регенерацию тканей, оказывая благоприятное действие при лечении трофических и лучевых язв. Некоторые флавоноиды, в частности катехины, повышают сопротивляемость организма облучению, увеличивая продолжительность жизни подопытных животных - опухоленосителей до 69 % в сравнении с контролем.

Флавоноиды широко распространены в растительном мире, и присущи в основном высшим растениям. Было установлено, что биологическое действие обширной группы флавоноидных препаратов зависит от их структуры [15]. Из флавоноидов наибольшим биологическим эффектом обладал лейкоэфдин (группа лейкоантоцианидинов), который в малых дозах (5 мг/кг) оказывал радиозащитное, в средних (35 мг/кг) в основном радиосенсибилизирующее и в больших (70-80 мг/кг)

противоопухолевое действие. Группа катехинов проявила радиосенсибилизирующие свойства, кверцетин обладал умеренным противоопухолевым и выраженным радиозащитным действиями [16-17].

Большой интерес исследователей вызывают флавоноиды как перспективные противоопухолевые средства. В отличие от средств, обычно применяемых в терапии новообразований, флавоноиды, обладающие противоопухолевой активностью, нетоксичны и способны предотвращать метастазы при некоторых видах лимфосаркомы. Во многих экспериментальных исследованиях на культурах клеток продемонстрировано противолучевое и противоопухолевое действие флавоноидов.

Для флавоноидов, как и для других природных веществ, не существует способа выделения, универсального для всех растительных материалов. Наиболее часто используются избирательная экстракция, осаждение с помощью солей тяжелых металлов и хроматографические методы.

Метод избирательной (селективной) экстракции заключается в извлечении флавоноидов из растительного материала различными растворителями в определенной последовательности. Спиртовое извлечение упаривают, к остатку добавляют горячую воду и после охлаждения удаляют неполярные соединения (хлорофилл, жирные масла, эфирные масла и др.) из водной фазы хлороформом или четыреххлористым углеродом.

Флавоноидные гликозиды извлекают из водной фазы последовательно этиловым эфиром (агликоны), этилацетатом (в основном монозиды) и бутанолом (биозиды, триозиды) [18].

Широта терапевтического действия, присущего как индивидуальным, так и суммарным флавоноидам, многообразие физико-химических свойств обусловили создание большого числа их лекарственных форм. На основе природных флавоноидов разработаны более 100 комплексных флавоноидных препаратов и еще большее число лекарственных форм.

В области химии полифенольных соединений в настоящее время достигнуты значительные успехи за счет концентрации усилий ряда научных школ на данном направлении. Препараты на основе растительных полифенолов и растений, богатых соединениями данного класса, находят широкое применение в медицине. Известны препараты «Силибор», «Силибинин» («Легалон»), «Катерген», «Валлилив», «Диквертин», «Лохеин», «Силимарин», «Максар», «Фламин», «Конвифлавин», «Флакумин», «Альтан», применяемые в качестве гепатопротекторов и желчегонных средств. В Казахстане вышеназванные препараты пока не производятся. Данные препараты на основе полифенолов растений Казахстана за счет наличия значительной ресурсной базы растительного сырья могут быть внедрены в масштабное производство и выйти на мировой рынок.

В качестве средства, повышающего общую устойчивость организма известен водно-спиртовой экстракт гребней винограда, содержащий комплекс полифенольных соединений и обладающий антиоксидантным, противовоспалительным, фунгистатическим, антимикробными действиями [19].

Известно из источников литературы [20] лекарственное средство из экстракта гребней калины, полученное на 40% этаноле и содержащее в химическом составе флавоноиды, оказывающее выраженное гепатопротекторное действие на модели алкогольной интоксикации.

На основе экстракта лимонника китайского разработано гепатопротекторное средство, повышающее сопротивляемость организма к воздействию химических веществ техногенного происхождения, стрессовым ситуациям, алкогольным отравлениям [21].

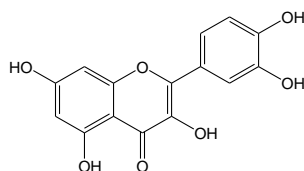
Получен биотехнологическим методом экстракт из биомассы *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. Экстракт в химическом составе содержит полифенольный комплекс, состоящий из дайдзеина (1), генистеина (2) и маакаина (3) [22].

Калефлон представляет собой порошок светло-коричневого (до коричневого) цвета со слабым специфическим запахом. Практически нерастворим в воде и спирте [23-24].

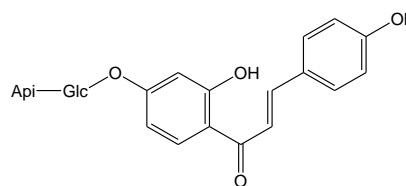
Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонон) (6) - самый универсальный биофлавоноид, мощный антиоксидант, одно из лучших натуральных антигистаминных и противовоспалительных средств. Кристаллический порошок желтого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в растворах щелочей [25-27].

Способ получения кверцетина (6) заключается в том, что древесину лиственницы одновременно подвергают окислению сернистокислым натрием и гидролизу перегретым водяным паром с последующей быстрой декомпрессией [28].

Ликвиритон (*Liquiritinum*) содержит сумму флавоноидов из корней солодки голой или солодки уральской, не менее 55 % суммы флавоноидов, в пересчете на ликуразид (7).



(6)



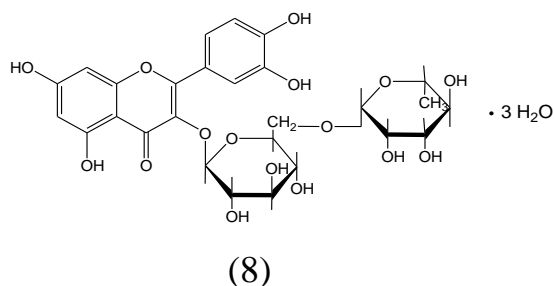
(7)

В технологии получения ликвиритона впервые в промышленном масштабе реализован процесс хроматографирования на полиамидном сорбенте, который широко используется в исследованиях по выделению индивидуальных веществ фенольной природы.

Технология комплексной переработки солодки позволяет при производстве глицирама или очищенного экстракта одновременно получать порошкообразную субстанцию проликвиритона, содержащую около 20 % флавоноидов (в ликвиритоне - около 55%) [29-30].

Рутин (8) (3-Рутинозид кверцетина; 3-рамногликозил-3,5,7,3',4',-пентаоксифлавонон). Рутин представляет собой мелкокристаллический порошок зеленовато-желтого цвета. Практически нерастворим в воде,

ацетоне, бензоле, хлороформе, эфире, трудно - в кипящем этаноле, мало растворим в этаноле, растворим в разбавленных растворах едких щелочей.



Сырьем для производства служат бутоны цветов софоры японской (*Sophora japonica* L.) семейства Бобовых (*Leguminosae*). Для выделения рутина (8) из бутонов софоры японской экстракцию проводят горячей водой. При охлаждении водных извлечений рутин выпадает в осадок, его отфильтровывают и очищают перекристаллизацией из спирта. Выход 10-12 % от веса воздушно-сухого сырья [31].

Рутинсодержащие таблетки Амитетравит, представляющий собой комплекс поливитаминов и аминокислот, используют в качестве адаптогенного средства [32-33].

Капсулы водорастворимого рутина обеспечивает его наиболее полную биодоступность по сравнению с другими твердыми лекарственными формами. Спектрофотометрическое определение рутина проводят в растворах или непосредственно с хроматограмм после закрепления окраски пятен специфическими проявителями [34-35].

Салсоколлин - создан на основе экстрактивных веществ надземной части солянки холмовой, однолетнего травянистого растения *Salsola collina* Pall. ex Spreng, содержащий комплекс биологически активных веществ [1, 36-37].

В экстракте солянки холмовой определены фенольные соединения (рутин (8), кверцетин (6), изорамнетин-3-гликозид, трицин), аминокислоты, дубильные вещества, углеводы [38].

Порошок от светло-коричневого до коричневого цвета, полученный экстрагированием из надземной части солянки холмовой (*Salsola collina* Pall.)

70 %-ным этиловым спиртом. Растворим в воде, спиртах, имеет специфический запах и вкус.

Высокая антиоксидантная активность препарата, связанная с присутствием флавоноидов, обеспечивает гепатопротекторный эффект.

Препарат уменьшает выраженность болевого, диспептического, астенического, цитолитического и холестатического синдрома, благотворно воздействует на липидный, пигментный, белковый обмен [39].

Препарат показан при хронических вирусных, алкогольных, токсических гепатитах, циррозах печени различной этиологии; при дискинезиях желчевыводящих путей и хронических бескаменных холециститах. В качестве профилактики холелитиаза; при приеме большого количества веществ и медикаментов, отягчающих функции печени; в качестве лечебного и профилактического средства при хронических гастритах и ишемической болезни сердца [40-41].

Применение дифференциально-спектрофотометрического метода позволило определить сумму флавоноидов в присутствии других полифенольных соединений в препарате «Салсоколлин», не образующих комплекса с алюминия хлоридом в среде 95 % этилового спирта при pH 2,0-3,0. Максимум поглощения растворов препарата «Салсоколлин» соответствует спектральным характеристикам стандартного образца рутина (8), что позволило использовать для дальнейших исследований показания оптической плотности растворов опытных образцов при $\lambda=411$ нм [42].

Технология получения субстанции «Салсоколлин» из травы солянки холмовой включает следующие этапы: четырехкратная экстракция 70 % спиртом, упаривание на ротационном испарителе и высушивание промежуточного продукта солянки холмовой методом сублимации [43].

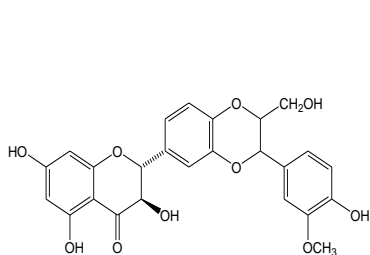
Силибор - суммарный препарат, состоит из суммы флаволигнанов. Основными компонентами суммы являются силидианин, силибин и их дегидропроизводные [44]. В 1 таблетке Силибора содержится: силимарина (в пересчете на 100% содержание флаволигнанов [силимарина]) 35 мг).

Силимарин представляет собой смесь по меньшей мере семи флаволигнанов, содержащихся в экстракте семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.). Основная доля приходится на силибин (9), силидианин (10) и силикристин (11).

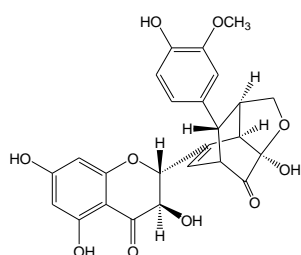
Силибор является аналогом зарубежных препаратов типа легалона и карсила. Источником сырья является плоды расторопши пятнистой. В качестве стандартного образца при стандартизации таблеток Силибор используется силибин (9) [45].

Разработана промышленная комплексная технология переработки плодов расторопши пятнистой [46-47]. По результатам исследований получены масло расторопши - субстанции силибор - гепатопротекторного действия [48-49].

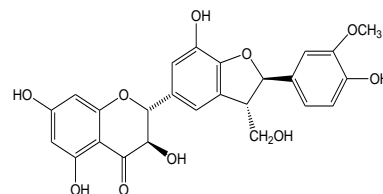
Способ комплексной переработки плодов расторопши пятнистой заключается в том, что из плодов расторопши выделяют масло, затем маслом экстрагируют траву ромашки и календулы и оставшийся жмых подвергают переработке. В результате осуществления способа получают средство, обладающее гепатозащитным действием, средство для лечения кожных заболеваний и корм для скота.



(9)



(10)



(11)

Известен способ получения суммы флаволигнанов (препарат «Карсил» гепатопротекторного действия), по которому измельченные плоды расторопши обезжиривают циклогексаном в соотношении 1:3 (сырье-растворитель) в течение 3 ч. При температуре 75-80⁰С. Недостатком данного способа является многостадийность и использование больших количеств растворителей.

Известен также способ получения масла расторопши пятнистой, которое обладает ранозаживляющей активностью. Из плодов расторопши выделяют масло, обладающее ранозаживляющим действием, затем маслом экстрагируют траву ромашки и календулы с получением лекарственного средства, обладающего противовоспалительным и ранозаживляющим действием, жмых, оставшийся после выделения масла, экстрагируют этиловым спиртом при нагревании и перемешивании, затем экстракт концентрируют, концентрат очищают петролейным эфиром при соотношении 2:1 соответственно, и осаждают целевой продукт, обладающий гепатопротекторным действием, 0,025%-ным раствором соляной кислоты; шрот, образовавшийся в процессе переработки расторопши пятнистой, используют в качестве кормовой добавки для скота.

Жирное масло, которое выделяют из плодов расторопши методом механического прессования, используется как самостоятельный продукт, так и в качестве составной части лекарственного средства при лечении кожных заболеваний и ожогов.

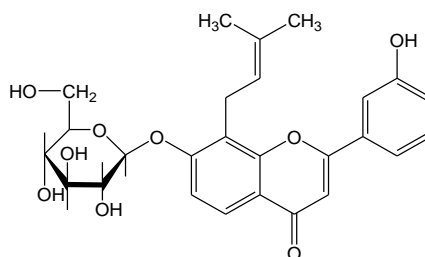
Способ получения суммы флаволигнанов заключается в экстракции жмыха 8%-ным этиловым спиртом методом быстротекучей реперколяции, упаривании спиртовых извлечений до водного кубового остатка, очистки петролейным эфиром для удаления остатков жирного масла и осаждения флаволигнанов 0,025%-ным раствором соляной кислоты. Полученный остаток, содержащий до 65-80% действующих веществ, является препаратом силимар для лечения заболеваний печени и нормализации пищеварительного процесса. При получении препарата силимар в сравнении с известным способом получения препарата карсил обезжиривание проводится методом механического прессования без использования органического растворителя, что ускоряет, упрощает и значительно удешевляет данную стадию и позволяет получить жирное масло для дальнейшего использования в качестве самостоятельного лекарственного средства и композиции. Не требуется дополнительная сушка сырья для удаления циклогексана. Экстракция 80%-

НЫМ этиловым спиртом исключает использование пожароопасных циклогексана и ацетона. При этом, использование метода быстротекущей реперколяции с нагреванием и перемешиванием ускоряет процесс и повышает выход действующих веществ в возможно более полном объеме при сохранении природной комбинации.

Флакарбин (Flacarbinum) - комбинированный препарат, в 100 г которого содержится по 2 г ликуразида (7) и кверцетина (6), по 10 г пектина и натрий-карбоксиметилцеллюлозы и 76 г глюкозы. Противязвенное действие гранул Флакарбина обусловлено содержанием кверцетина и ликуразида из солодки [43]. Применяют как противовоспалительное, спазмолитическое, капиллярукрепляющее и мягкопослабляющее средство у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Выпускают в гранулах зеленовато-желтого цвета, сладковатого вкуса [50-51].

Флакозид (Flacosidum), получаемый из листьев бархата амурского (*Phellodendron Amurense* Rupr.) и листьев бархата Лавалея (*Phellodendron Amurense* var. *Lavallei* Sprague), семейство Рутовых (*Rutaceae*).

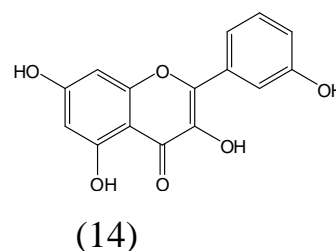
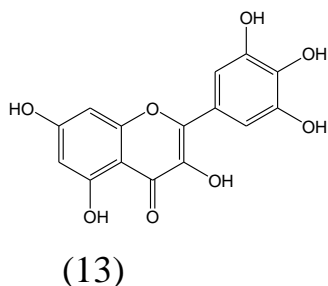
По химическому строению флакозид (12) представляет собой 7-β-D-глюкопиранозид - 8 (3-метил-бутил-2-энил)-4',5,7-триоксифлаванон. Он близок по структуре рутина (8) и другим флавоновым соединениям группы витамина Р [52]. Активными компонентами препарата являются флавоноиды, которые угнетают репликацию вирусов простого герпеса I и II типа, вируса *Varicella zoster* и вируса Эпштейна-Барр [53-54]. Содержание флакозида (12) определяют хроматоспектрофотометрическим методом [55-57].



(12)

Флакумин (Flacuminum) - представляет собой сумму флавоноидных агликонов получаемых из листьев скумпии (*Cotinus coggygia* Scop), сем.

Сумаховых (*Anacardiaceae*). Флакумин, содержащий флавонолы (мирицетин (13), кверцетин (6), кемпферол (14)), и фламин, в состав которого входят халконы, флавоны, флавононы, флавонолы [58-61].

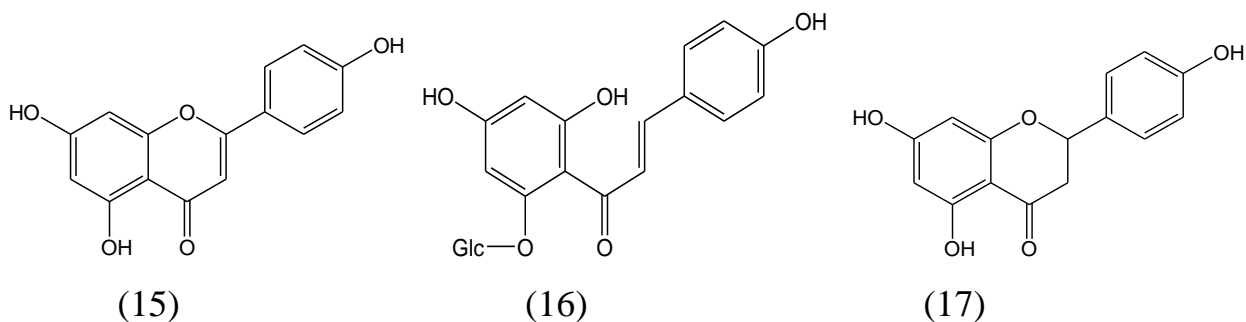


Зеленовато-желтый мелкокристаллический порошок со слабым специфическим запахом, слегка горького вкуса. Практически нерастворим в воде, мало - в спирте. Обладает желчегонным эффектом, оказывая главным образом спазмолитическое действие на желчные ходы и способствуя выделению желчи из желчного пузыря. Применяют в качестве желчегонного средства, особенно при дискинезии желчевыводящих путей. Форма выпуска: таблетки, покрытые оболочкой желтого цвета [62-64]. Как противоожоговое средство рекомендуют использовать флакуминовую мазь и 15% прополисную мазь с добавлением 0,1 % цетилпиридиния хлорида [65]. Применяется как противовирусное, гепатопротективное, антиоксидантное средство. Активен против ДНК-содержащих вирусов группы герпеса [66].

Фламин представляет собой смесь флавоноидов. Сырьем для производства фламина используют цветки бессмертника песчаного (*Helichrisum arenarium* (L.) Moench.). Фламин оказывает желчегонное и противовоспалительное действия, назначают при холесцистите, холангите. Усиливает секрецию желчи и увеличивает содержание в ней билирубина, повышает тонус желчного пузыря и способствует оттоку желчи [67].

Известно, что в цветках бессмертника и фламине содержится сумма флавоноидов (не менее 20 соединений), относящихся к различным группам: флавоны (апигенин (15), лютеолин (4)), флавонолы (кемпферол (14), кверцетин (6) и их гликозиды, 3,5-дигидрокси-6,7,8-

триметоксифлавоноловые гликозиды), халконы (изосалипурпозид (16)), флаваноны (+)-нарингенин, (-)-нарингенин (17) и их глюкозиды).



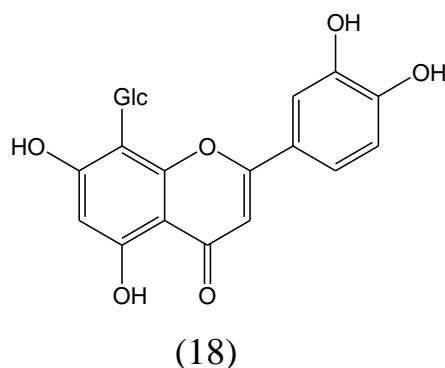
Препарат «Фламин» оказывает расслабляющее действие на гладкую мускулатуру сфинктеров желчного пузыря и желчевыводящих путей, изменяет вязкость и химический состав желчи. Стимулируя выделение желудочного сока и замедляя эвакуаторную функцию желудка и кишечника, способствует более качественному перевариванию пищи. Выпускают в таблетках по 0,05 г [68].

Желтый негигроскопичный порошок с содержанием флавоноидов 95% и более, со слабым специфическим запахом и горьким вкусом. Растворим в 50% и 96% этиловом спирте, плохо растворим в воде, практически нерастворим в хлороформе, бензоле и дихлорэтаноле. Общий выход препарата составляет приблизительно 70% от содержания флавоноидов в сырье [68].

Технология выделения и очистки флавоноидов из сырья бессмертника песчаного включает экстракцию 50%-ным этанолом выпарку в вакууме на роторном испарителе, фильтрацию, экстракцию жидкость – жидкость, упаривание на роторной пленочной установке в вакууме, сушку, измельчение сухой массы до получения однородного порошка фламина [68-69].

Хелепин (Helerinum) - очищенный экстракт из надземной части растения леспедецы копеечковой (*Lespedeza hedyosaroides* (Pall.) Kitag), сем. Бобовых (*Fabaceae*). Аморфный порошок зеленовато-желтого цвета с сероватым или зеленоватым оттенком, гигроскопичен. Обладает

противовирусной активностью в отношении ДНК-содержащих вирусов группы герпеса [46, 60]. Применяют у взрослых внутрь и наружно при опоясывающем герпесе, рецидивирующих формах простого герпеса, при заболеваниях слизистых оболочек полости рта вирусного происхождения. Местно применяют в виде 5 % мази на кожу и 1 % мази на слизистые оболочки. Препарат более эффективен при начальных формах заболевания, поэтому лечение рекомендуется начинать при ранних признаках заболевания или рецидива. Форма выпуска: таблетки, покрытые оболочкой желтого цвета, по 0,1 г в упаковке по 10 и 20 штук; 1 % или 5 % мазь от серовато-желтого до коричневого (с зеленоватым оттенком) цвета в упаковке по 20 г [46]. Данный препарат содержит сумму флавоноидов, в пересчете на ориентин (18) (55 % и более).



Технология комплексной переработки солодки позволяет при производстве глицирама или очищенного экстракта одновременно получать порошкообразную субстанцию, содержащую около 20 % флавоноидов.

Казахстанский препарат из солодки «Рувимин» применяют при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хронических гастритах в качестве спазмолитического, антисекреторного, противовоспалительного и способствующего регенерации слизистой оболочки средства [2].

Легалон обладает гепатопротекторным и антиоксидантным действием. Механизм действия связан с ингибированием перекисного окисления липидов, вследствие чего предотвращается разрушение клеточных мембран. Антиоксидантный эффект Легалона обусловлен взаимодействием

силибинина (9) со свободными радикалами в печени и преобразованием их в менее токсичные соединения. Тем самым прерывается процесс перекисного окисления липидов и не происходит дальнейшего разрушения клеточных структур; токсины обезвреживаются физиологическим путем. Легалон стимулирует биосинтез структурных и функциональных белков и фосфолипидов (за счет специфической стимуляции РНК-полимеразы А) и ускоряет регенерацию клеток печени. Клиническое действие Легалона проявляется в улучшении общего состояния заболевших с заболеваниями печени, уменьшении субъективных жалоб (таких как слабость, ощущение тяжести в правом подреберье, потеря аппетита, кожный зуд, рвота). Улучшаются лабораторные показатели: понижение активности трансаминаз, гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы и уровня билирубина в плазме крови. Длительное применение Легалона достоверно увеличивает процент выживаемости заболевших, страдающих циррозом печени.

Препарат «Легалон» является эталонным гепатопротектором, который рекомендован официальными изданиями Фармакопейного комитета в качестве препарата сравнения при испытании новых средств, обладающих гепатопротекторными свойствами растительной природы и выпускается в виде драже, капсул и суспензий [69-70].

Самарским государственным медицинским университетом проведено изучение химического состава тополя бальзамического и установлено наличие комплекса БАВ: эфирные масла, флавоноиды, фенольные соединения, органические кислоты, широкий спектр макро- и микроэлементов [71].

В Северо-Казахстанском государственном университете проведено изучение химического состава почек тополя бальзамического, которое позволило создать лекарственные формы для применения в области стоматологии, гинекологии и дерматологии, разработать способы получения кормовых добавок и рострегулирующих композиций и предложить безотходную технологию переработки сырья. Кроме того, препараты на

основе почек тополя оказывают болеутоляющее и регенерирующее действие, обладают способностью выводить соли из отложений и проявляют противовоспалительную, ранозаживляющую, антибактериальную активность. Простой способ получения субстанции на основе экстрактивных веществ “Тополин” может стать основой для создания лекарственных форм и широкого их применения в медицине. Налажено производство и выпуск лекарственных форм на основе масла почек тополя (экстракты, мази, свечи, пленки) [72].

Полифенольные соединения, которыми богаты многие растения, эффективно уменьшают перекисное окисление липидов. Окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) активнее захватываются макрофагами, чем немодифицированные, вследствие чего увеличивается накопление холестерина в интимае аорты. Снижение окисления ЛПНП под действием антиоксидантных препаратов приводит к антиатеросклеротическому эффекту [73-76].

Отдельную группу флавоновых препаратов образуют средства, полученные из подземных органов шлемника байкальского.

На основе сухого экстракта из корней и корневищ шлемника байкальского разработан препарат «Скутекс», выпускающийся в виде таблеток, покрытых оболочкой. Основными действующими веществами препарата являются флавоновые глюкуроныды – байкалин, вогонозид, ороксилонид и другие.

Препарат проявляет ноотропные свойства, улучшает процессы обучения и памяти, уменьшает последствия гипоксической травмы при профилактическом применении и лечении развитой энцефалопатии в отдаленные периоды после полученной травмы.

В экспериментальных и клинических исследованиях было выявлено, что скутекс предупреждает развитие нарушений обучения и памяти, возникающие под влиянием скополамина, в амнестическом и диссоциирующем типе действия, уменьшает проявление синдрома отмены

после длительного применения бенздиазепиновых транквилизаторов, уменьшает токсичность гексенала, алкоголя, коразола, бикакумина и тиосемикарбазида; проявляет умеренное противояггессивное действие, улучшает поведение в конфликтной ситуации и после перенесенного стресса, а также улучшает интегративные функции мозга.

Скутекс назначают для лечения больных с астеническими и астенодепрессивными состояниями соматогенного и психогенного генеза, больных с энцефалопатиями разнообразного генеза. Препарат может назначаться в сочетании с другими ноотропными средствами для больных, которые применяют фармакотерапию длительное время и для профилактики стрессорного состояния. Скутекс рекомендуется также для лечения больных с церебральным атеросклерозом в сочетании с гипертонической болезнью [88].

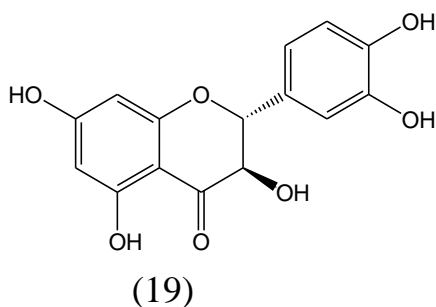
Среди препаратов флавоноидной природы, обладающих нейротропным и психотропным эффектом следует упомянуть билобил (производства KRKA, Словения). Билобил представляет собой стандартизованный экстракт листьев растения *Ginkgo biloba* L., в составе которого содержатся биофлавоноиды аментофлавоны, гинкгетин, а также флавоноидные гликозиды кемпферола (14), кверцетина (6) и ряд других веществ. Имеются данные о нейропротекторном эффекте билобила при церебральной ишемии у экспериментальных животных и у детей с синдромом дефицита внимания, нейроциркуляторной дистонией и гиперактивностью [89].

Для перспективных разработок используются новые соединения флавоноидной природы различных классов, а также ряд из синтетических производных и комбинаций с другими природными и синтетическими компонентами [90-91].

Кроме упомянутых препаратов, разработаны и предложены для практической медицины Р-витаминные препараты из аронии черноплордной на основе антоцианов, из листьев чая – на основе катехинов, из плодов

цитрусовых – на основе флаванонового гликозида гесперидина и его халконового изомера [92].

Индивидуальное соединение диквертин (19) (дигидрокверцетин или 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаванон или таксифолин), получено из древесины хвойных Н.А. Тюкавкиной с соавторами [93-95] рекомендован в качестве антиоксиданта для лечения различных заболеваний и в виде пищевой добавки. Выпускается индивидуально или в комбинации с аскорбиновой кислотой в виде таблеток.



Необходимо отметить, что создание лекарственных форм на основе субстанций природного происхождения обеспечивает максимальную биологическую доступность природных веществ, точное и непрерывное дозирование в течение длительного промежутка времени и устранение биодеструкции ферментами желудочно-кишечного тракта.

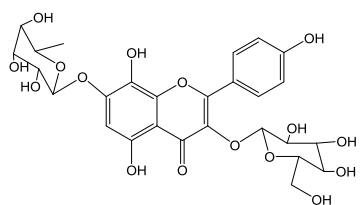
1.2. Применение центробежной хроматографии распределения для выделения и очистки флавоноидов

В последнее время широкое распространение получает сравнительно новый вид хроматографии - центробежная хроматография распределения (ЦХР) – метод, позволяющий избежать проблем, связанных с твердофазными адсорбентами и сохранить химическую целостность смесей, подвергаемых разделению, при этом ЦХР обеспечивает высокую скорость разделения, не требует большого количества дорогостоящих элюентов, что значительно снижает себестоимость целевого продукта (табл. 1.1.).

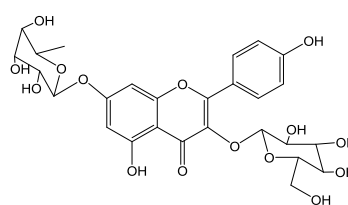
Таблица 1.1 - Сравнительные характеристики хроматографии нормального давления (ХНД), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) флеш-хроматографии (ФХ-1), флюидной хроматографии (ФХ-2) и центробежной хроматографии распределения (ЦХР)

| Основные характеристики | ХНД | ВЭЖХ | ФХ-1 | ФХ-2 | ЦХР |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| Сорбент | используется | используется | используется | используется | не используется |
| Процент возврата пробы | < 100 % | < 100 % | < 100 % | < 100 % | 100 % |
| Качество растворителя | высокое | высокое | высокое | высокое | низкое |
| Потребление растворителя | большое | большое | большое | большое | малое |
| Подготовка пробы | дополнительная обработка | дополнительная обработка | дополнительная обработка | дополнительная обработка | фильтрация |
| Производственные расходы | высокие | очень высокие | очень высокие | высокие | невысокие |

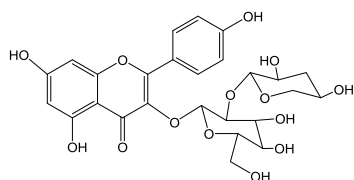
Например, центробежная хроматография распределения была успешно использована авторами [95] при исследовании экстракта родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), полученном ультразвуковой экстракцией в воде с добавлением бромида 1-этил-3-метилимидазолия (2 моль/л), методом высокоскоростной жидкость-жидкостной хроматографии выделены 4 флавоноидных гликозида: гербацетин-3-О-d-глюкопиранозил-7-О-1-рамнопиранозид (20), кемпферол-3-О-d-глюкопиранозил-7-О-1-рамнопиранозид (21), кемпферол-3-О-d-глюкопиранозид-(2→1)-d-ксилопиранозид (22) и гербацетин-8-О-d-глюкопиранозид (23). Разделение проводили на установке ТВЕ-300В с ротором объемом 280 мл, система растворителей этилацетат-н-бутанол-вода (4:1:5, об./об.), подвижная фаза – нижний слой.



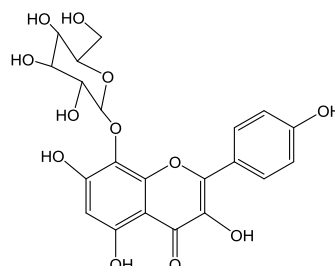
(20)



(21)

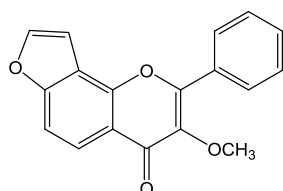


(22)

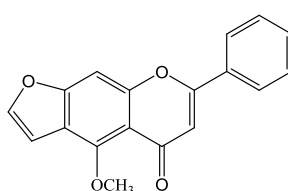


(23)

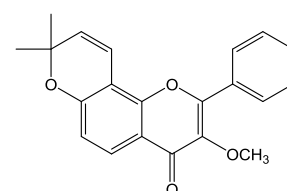
Использование жидкость-жидкостной хроматографии позволило получить три флавоноида: каранжин (24), пиннатин (25) и понгафлавоон (26) из этанольного экстракта *Millettia pinnata* (L.) Panigrahi. Разделение проводилось на установке ТВЕ-300А в системе растворителей, состоящей из н-гексан-ацетонитрил-дихлорметан-вода (5:5:1:5) [96].



(24)

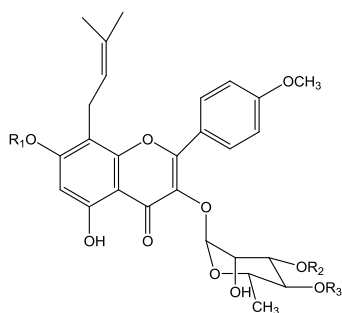


(25)



(26)

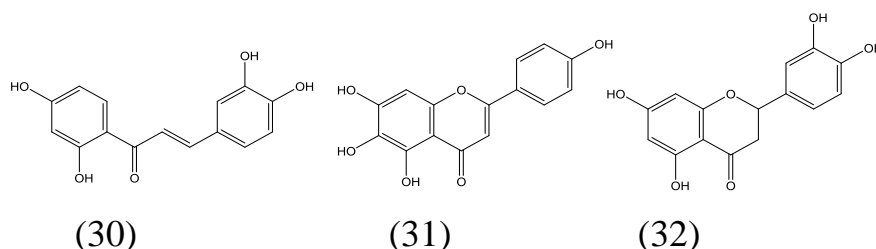
Успешно применен метод ЦХР для выделения и очистки трех флавоноидов из китайского лекарственного растения *Epimedium koreanum* Nakai с использованием в качестве двухфазовой системы растворителей состава хлороформ-метанол-вода (4:3,5:2). Метод обеспечил выход 11,4 мг эпимедокореанозида (27), 46,5 мг икариина (28) и 17,7 мг икаризида (29) из 200 мг пробы при одноступенчатом разделении с чистотой 98,2 %, 99,7 % и 98,5 %, соответственно (согласно данным ВЭЖХ) [97].



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|------|----------------|----------------|----------------|
| (27) | Glc | β-(6-Ac)Glc | Ac |
| (28) | Glc | H | H |
| (29) | H | H | H |

(27-29)

Несколько флавоноидов, включая 2',3,4,4'-тетрагидроксиалкон (30), 5,6,7,4'-тетрагидроксифлавоон (31) и бутин (32), из семян *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd были разделены методом высокоскоростной противоточной хроматографии с использованием двухступенчатой процедуры. Использовали два различных типа систем растворителей: смесь хлороформ - дихлорметан - метанол – вода (2:2:3:2) и смесь 1,2-дихлорэтан - метанол - ацетонитрил - вода (4:1,1:0,25:2). Из 1 кг семян этим методом выделено около 45 мг 2',3,4,4'-тетрагидроксиалкона (30), 40 мг 5,6,7,4'-тетрагидроксифлавоона (31) и 55 мг бутина (32). Каждый выделенный компонент имел чистоту 95-97 % (по данным ВЭЖХ) [98].



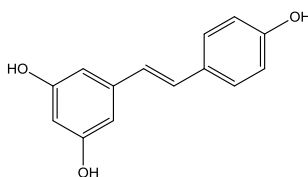
(30)

(31)

(32)

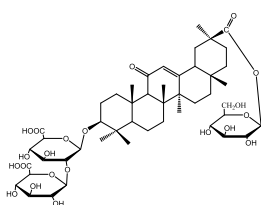
Проведено успешное разделение этилацетатного экстракта косточек европейского винограда *Vitis vinifera* L. в системе гексан:этилацетат:этанол:вода в соотношении (1:8:2:7, об./об.). При этом получены две фракции: первая содержащая около 75 % флавоноловых мономеров – катехин и эпикатехин (18 % в пересчете на массу экстракта), вторая содержащая фракцию В-димеров (22 % в пересчете на массу экстракта). При разделении экстракта стеблей винограда авторами выделена фракция стильбенов, состоящая из ресвератрола (33) и его олигомеров (12 % от массы экстракта), из которой, при использовании той же системы растворителей, но при соотношении 4:5:3:3 (об./об.) выделен транс-

ресвератрол (33) с чистотой более 90 % (выход 7 % в пересчете на массу экстракта) [99].

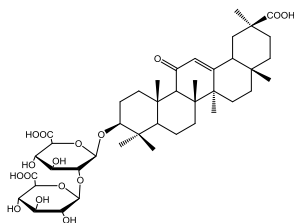


(33)

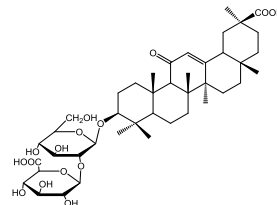
Авторами [100] разработан способ, который использует преимущества кислотных свойств разделяемых веществ, для одновременного разделения тритерпеноидных сапонинов и гликозидных флавоноидов из солодки с применением противоточной хроматографии с контролем показателя pH. В верхний органический слой (стационарная фаза) системы этилацетат:н-бутанол:вода (2:3:5, об./об.) приливали 10 мМ трифторуксусной кислоты и 10 мМ аммиака в нижний водный (подвижная фаза). При этом при разделении этанольного экстракта выделены три тритерпеноидных сапонины и гликозиды флавоноидов сапонин А3 (34), глицирризиновая кислота (35), 3-О-[β-D-глюкуропиранозил-(1→2)-β-D-галактопиранозил] глицирретовой кислоты (36), апиозид ликуиритина (37) и ликуиритин (38).



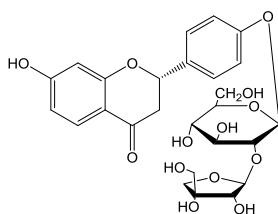
(34)



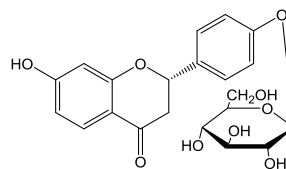
(35)



(36)



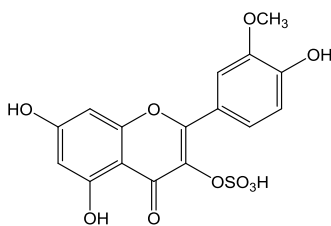
(37)



(38)

Авторами [101] при разделении водно-спиртового экстракта *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze методом противоточной хроматографии выделен сульфат-3 изорамнетина (39). Разделение экстракта первоначально проводили на

стеклянной колонке с макропористой смолой D4020 сначала водой, затем 90% этиловым спиртом. Элюат упарили и разделяли на противоточном хроматографе в системе растворителей н-бутанол-этилацетат-вода (4:1:5, об./об.), при этом выделен сульфат-3 изорамнетина (39) с чистотой 93,4 %. Применение в качестве системы растворителей смесь н-бутанола и 0,25 % раствора хлорида натрия (1:1, об./об.) даже без первичной обработки экстракта позволил получить сульфат-3 изорамнетина (39) с чистотой 97 %, выход составил 0,55 % в пересчете на экстракт.



(39)

На основе имеющихся в литературе данных можно сделать следующее заключение:

1 Технологии выделения и очистки биологически активных веществ флавоноидов – субстанций лекарственных препаратов – достаточно долгий, трудоемкий многостадийный процесс, требующий использования большого количества дорогостоящих, зачастую, токсичных органических растворителей.

2 Центробежная хроматография распределения обеспечивает высокую скорость разделения, не требует применения твердых сорбентов и дорогостоящих элюентов, использование растворителей сокращается в 10 раз, что значительно снижает себестоимость целевых продуктов. Поскольку ЦХР обеспечивает эффективное разделение веществ механизмом, который полагается исключительно на распределение веществ между растворителями, основой успешного разделения данным методом является правильный выбор хроматографической системы растворителей и требует индивидуального подхода к каждому объекту разделения.

Поэтому разработка эффективных, экономичных и экологически безопасных технологий выделения и очистки фармакологически активных флавоноидов – источников новых оригинальных лекарственных фитопрепаратов, с применением современных хроматографических методов, является актуальной и приоритетной задачей.

Растения семейства ивовых (*Salicaceae*) и, в частности рода *Populus L.* (тополь), являются перспективными источниками многих биологически активных веществ. Тополы насчитывают 30 видов. Большинство этих видов широко распространены на территории СНГ, из них 15 видов встречаются в Казахстане, которые интересны по своему многообразию, запасам и возможностям практического применения в народном хозяйстве Республики [102].

Большую группу фармакологических соединений изучаемых видов тополей составляют флавоноиды, которые еще называют полифенолами и биофлаваноидами, куда входят флавоны, флавонолы, флаваноны, халконы, катехины, антоцианы, изофлаваноиды, биофлаваноиды [103].

Примечательно, что почки тополя лавролистного по флавоноидному составу особенно близки к почкам тополя черного, за исключением пинобанксина. При этом важно подчеркнуть, что основные флавоноиды в почках тополя лавролистного, как и в случае тополей черного, дельтовидного [104] и бальзамического [105], представлены хризином, пиностробином и пиноцембрином, причем для последнего описана выраженная антимикробная и противогрибковая активности [106].

Физиологическая активность суммарных препаратов из тополей в определенной степени связана с присутствием в них органических кислот: яблочной, лимонной, виннокаменной и др. Многие из них проявляют антисептическую (например, бензойная, салициловая), желчегонную (производные кофейной кислоты), детоксицирующую (урановые кислоты) способность тормозить превращение углерода в жир (виннокаменная кислота), противовоспалительную (антикоричные кислоты) [107].

К сожалению, на сегодняшний день единичны случаи применения отдельных индивидуальных флавоноидов - монопрепаратов в медицинской практике, несмотря на их широкое разнообразие, возобновляемость источников и доступность их получения. В связи с этим ранее нами на основе доступного флавоноида - пиностробина, получено новое производное - оксим пиностробина, обладающий более выраженной биологической активностью в сравнении с исходным флавоноидом [108].

Таким образом, обобщая результаты, считаем перспективным проведение работ в плане разработки эффективной, экономичной и экологически безопасной технологии выделения и очистки пиностробина из почек тополя бальзамического, с последующим синтезом оксима пиностробина и созданием на его основе отечественного высокоэффективного фитопрепарата.

Заключение по 1 главе

Таким образом, флавоноиды относятся к числу чрезвычайно широко распространенных растительных метаболитов. Для более 7500 флавоноидов, относящихся к нескольким десяткам структурных типов, описана точно установленная структура молекул. Всесторонним исследованием флавоноидов, включающим помимо установления структуры раскрытие их полезных свойств, в частности фармакологической активности, занимаются ученые крупных научных школ во многих странах мира. Интерес к этим соединениям постоянно растет, чему в немалой степени способствуют такие исключительно ценные свойства флавоноидов, как антиоксидантная активность и связанная с ней способность многих метаболитов этого класса действовать в качестве агентов, предотвращающих или тормозящих образование опухолей, укрепляющих кровеносные сосуды, защищающих печень и желудочно-кишечный тракт, стимулирующих работу мозга и сердца, являющихся биологически активными добавками в лечебном и диетическом питании.

Например, в действующий Государственный реестр лекарственных средств России включено свыше 260 видов лекарственного растительного сырья и более 600 препаратов растительного происхождения. Большой интерес среди них представляют источники фенольных соединений и полисахаридов. На их основе создана значительная часть лекарственных средств природного происхождения с широким спектром фармакологического действия: сосудоукрепляющего, желчегонного, кардиотонического, антимикробного, гепатопротекторного, противовоспалительного, антиоксидантного, противоопухолевого, иммуномодулирующего, фармакосанирующего и другого, для лечения и профилактики ряда заболеваний.

Поэтому исследования, направленные на изучение природных источников фенольных соединений, изучение их химического состава, фармакологического действия, стандартизация сырья, расширение сырьевой базы используемых в медицинской практике лекарственных растений для создания на их основе фитопрепаратов являются актуальной задачей.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям ОФС Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, ФС, ВФС и других нормативных документов, действующих на территории Республики Казахстан.

2.1. Материалы исследований

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».

Вспомогательные вещества

Крахмал (C₆H₁₀O₅)_n, синтезируемый разными растениями в хлоропластах, под действием света при фотосинтезе, несколько различается по структуре зёрен, степени полимеризации молекул, строению полимерных цепей и физико-химическим свойствам.

Безвкусный аморфный порошок белого цвета, нерастворимый в холодной воде. Под микроскопом видно, что это зернистый порошок; при сжатии порошка крахмала в руке он издаёт характерный скрип, вызванный трением частиц.

Кальция стеарат, порошок белого со слегка желтоватым оттенком цвета, практически не растворим в воде очищенной и 96 % спирте

Применяется как вспомогательное вещество в производстве лекарственных препаратов.

Лактоза безводная (4-О-(β-D-галактопиранозил)-D-глюкопираноза)

$d_4^{20}=1,5254$, $T_{пл}=223$ °С.

Белый или почти белый прозрачный порошок. Легко, но медленно растворим в воде, практически не растворим в спирте этиловом 96 %.

Магния карбонат основной. Тонкий порошок белого цвета, без запаха и вкуса. Не растворим в воде очищенной, растворим в разбавленных кислотах.

Повидон (Пласдон К29/32), ISP, Швейцария. Низкомолекулярный поливинилпирролидон. Используется как связующее вещество.

Натрия лаурилсульфат (SDS), Merck, Германия. Используется как поверхностно-активное вещество, солюбилизатор труднорастворимых субстанций.

Полоксамер Kolliphor P188 micro, BASF, Германия. Неионогенное ПАВ, сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, используется для улучшения растворения труднорастворимых субстанций лекарственных веществ за счет наличия в формуле гидрофобной и гидрофильной составляющих

Спирт этиловый 96 %. C_2H_5OH . (M_r 46.07). Прозрачная, бесцветная, подвижная, летучая жидкость с характерным запахом и жгучим вкусом. Легко воспламеняется, горит синеватым слабо светящимся бездымным пламенем, смешивается во всех соотношениях с водой, эфиром, хлороформом, ацетоном и глицерином (ГФ РК с. 419). Спирт этиловый широко используется в качестве растворителя и экстрагента.

Вода очищенная [ГФ РК, т. 1, с. 347, ФС 42-465-02]. H_2O . М.м. 18.

Бесцветная прозрачная жидкость без запаха и вкуса. $T_{кип}=100$ °С, $T_{пл}=0$ °С, $d_4^{20}=1,0$ г/см³.

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

Гептан. C_7H_{16} . (M_r 100.2). 1042000. [142-82-5].

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с этанолом (ГФ РК с. 348). Гептан используется в качестве растворителя.

Гексан. C_6H_{14} . (M_r 86.2). 1042600. [110-54-3].

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с этанолом (ГФ РК с. 348). Гексан используется в качестве растворителя.

Этилацетат. $C_4H_8O_2$. (M_r 88.1). 1035300. [141-78-6].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом (ГФ РК с. 448). Этилацетат используется в качестве растворителя.

Ацетонитрил. C_2H_3N . (M_r 41.05). 1000700. [75-05-8]. Метилцианид. Этаннитрил. Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, ацетоном и метанолом. (ГФ РК с. 339). Этилацетат используется в качестве растворителя.

2.2. Методы исследований

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-100A», 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),

тестер для определения растворения «Вращающаяся корзинка» марки «ERWEKA ZT 504» (Германия).

Физико-химические методы

Центробежная хроматография распределения

Разделение CO₂-экстракта почек тополя бальзамического проведено на установке FCPC-A200, ротор 250 мл, система растворителей гексан:этилацетат:ацетонитрил:вода (6:4:5:4), проба 2,3 г в 15 мл – верхней (стационарной) фазы и 10 мл – подвижной фазы, 25 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование 289 нм, скорость вращения ротора – 1400 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия.

Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение CO₂-экстракта почек тополя бальзамического, содержащей пиностробин, проводили на препаративной установке HPLC с применением обращенно-фазового варианта ВЭЖХ с использованием препаративной колонки 9,1x250 мм, заполненной сорбентом Microsorb 60-8 C18, с размером частиц 10 мкм, состав подвижной фазы: смесь ацетонитрил-вода-кислота уксусная 1% (50:49:1). При объемной скорости подачи элюента 4 мл в минуту полное разделение пробы происходит в течение 30 минут, температура колонки комнатная. УФ-детектирование при 289 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Определение количественного содержания пиностробина в почках тополя бальзамического, CO₂-экстракте почек тополя бальзамического, субстанции пиностробина, фракциях после разделения CO₂-экстракте почек тополя бальзамического на установке FCPC проводили на жидкостном хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме. В качестве стационарной фазы использовали аналитическую колонку 4,6x150 мм, заполненную сорбентом Zorbax SB-C18 (5 μм); подвижная фаза: ацетонитрил – вода - уксусная кислота 50:49:1 (об/об),

скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 289 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Количественное содержание оксима пиностробина в субстанции оксима пиностробина и лекарственном средстве «Оксим пиностробина, капсула, 50 мг», определяли на жидкостном хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме. В качестве стационарной фазы использовали аналитическую колонку 4,6x150 мм, заполненную сорбентом Zorbax SB-C18 (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – уксусная кислота 50:50 (об/об), скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 280 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Идентификация исследуемых компонентов основана на сравнении времени удерживания со временем удерживания стандартных образцов пиностробина и оксима пиностробина. Для подтверждения достоверности идентификации анализируемого вещества использован метод добавок.

ИК-спектроскопия

ИК-спектры образцов субстанций пиностробина и оксима пиностробина регистрировали на спектрометре «Termo Nicolet Avatar-360» (США) в таблетках с калия бромидом, в области от 4000 до 500 см⁻¹.

УФ-спектрофотометрия

УФ-спектры образцов субстанций пиностробина и оксима пиностробина снимали на приборе «Helios-β» (Великобритания), в области от 190 до 350 нм.

Химические методы: 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 (флавоноиды).

Фармакопейные методы

- определение цвета, вкуса, запаха субстанций пиностробина и оксима пиностробина; стандартного образца пиностробина проводили по методике, изложенной в ГФ РК, Т. 1, с. 548;

- определение растворимости субстанций пиностробина и оксима пиностробина; стандартного образца пиностробина в различных растворителях проводили по методике ГФ РК, Т. 1. с. 175;

- определение температуры плавления субстанций пиностробина и оксима пиностробина проводили по методике ГФ РК, Т. 1.;

- определение средней массы, распадаемости капсул оксима пиностробина проводили по ГФ РК, Т. 1, с. 244;

Биофармацевтические методы

Для фармацевтической оценки качества капсул оксима пиностробина по тесту «Растворение» испытания проводили согласно методик описанной в ГФ РК, Т.1.

Микробиологический метод

Испытание на микробиологическую чистоту субстанций пиностробина и оксима пиностробина и готовой лекарственной формы в капсулах проводили по методике, изложенной в ГФ РК, Т.1. и на основании руководства «Методы микробиологического контроля лекарственных средств», Алматы, 2000 г.

Статистическая обработка результатов

При обработке полученных результатов исследований применен метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0,95$). Для определения специфичности, линейной зависимости, правильности и воспроизводимости методики проведена валидация аналитических методик количественного определения активных компонентов и родственных примесей в лекарственных препаратах в соответствии с ОФС.

ГЛАВА 3

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУБСТАНЦИИ ПИНОСТРОБИНА И ЕЕ СТАНДАРТИЗАЦИЯ

3.1. Определение сырьевых запасов тополя бальзамического

Тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) сем. Ивовых (*Salicaceae*) распространен в Северной Америки, Канаде и северных штатах. Культивируется в России, на Кавказе и Средней Азии. Бальзамический тополь в Казахстане растет повсеместно и является перспективным возобновляемым источником биологически активного флавоноида пиностробина.

Общая площадь лесов в Северо-Казахстанской области составляет 542,7 тыс. га, что составляет 5,5% от общей площади территории. Основная масса тополя бальзамического расположена в полейзащитных полосах, площадь которых составляет 504,16 тыс. га. В пригороде областного центра имеется зеленая зона – 4,697 тыс. га. Вблизи поселка Прибрежное в экологически чистой зоне располагается лесоучасток тополя бальзамического - 2,5 га, где проводится сбор почек для научно-исследовательских работ в количестве 400 кг. Перспектива промышленной заготовки сырья составляет более 4 т. Годовой прирост тополевых насаждений 15-20 м³/га. Ранее разработан и утвержден ВАНД РК 42-492-12 на почки тополя бальзамического, который составлен на основании результатов анализов трех партий сырья, в соответствии с требованиями ГФ РК [109].

3.2. Подбор оптимальных условий углекислотной экстракции почек тополя бальзамического для количественного извлечения пиностробина

До последнего времени основу технологии извлечения биологически активных соединений из растительного сырья, которые являются

действующим началом фитопрепаратов, составляли традиционные способы - экстракция органическими растворителями (хлороформ; этиловый спирт и другие), удаление балластных веществ и последующее хроматографическое разделение полученных экстрактов методом колоночной хроматографии с использованием бензола, петролейного и диэтилового эфиров, этилацетата и других.

В целом технологии производства лекарственных препаратов растительного происхождения характеризуются многостадийностью, использованием дорогостоящих, легковоспламеняющихся, токсичных органических растворителей (хлороформ, бензол, петролейный эфир, гексан, ацетон и др.). Указанные особенности производственных циклов получения данных препаратов, безусловно, отражаются в конечном итоге на себестоимости продукции и вызывают ее удорожание. С другой стороны, применение токсичных растворителей на отдельных этапах производственного регламента не допускается по международным стандартам GMP, что снижает конкурентоспособность выпускаемой фармацевтической продукции и препятствует ее выходу на внешний рынок.

Поэтому разработка эффективных, экономичных и экологически безопасных технологий выделения и очистки фармакологически активных веществ – источников новых оригинальных лекарственных фитопрепаратов, является актуальной и приоритетной задачей.

Ранее для получения пиностробина и сопутствующих флавоноидов применяли экстракцию почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) 96 % этиловым спиртом [110]. Извлечение 96 % этиловым спиртом суммы экстрактивных веществ сложного состава, создавало значительные трудности для выделения и очистки пиностробина, что существенно снижало его выход. Поэтому с учетом физико-химических свойств пиностробина осуществлена сверхкритическая углекислотная экстракция почек тополя бальзамического, направленная на количественное извлечение пиностробина из растительного сырья.

Проведена сверхкритическая углекислотная экстракция почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) с изменением технологических параметров: давления, температуры, продолжительности процесса экстрагирования растительного сырья. Определены оптимальные условия сверхкритической флюидной экстракции почек тополя бальзамического, при которых достигается 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. 3.2.1), содержание пиностробина в CO₂-экстрактах определяли методом ВЭЖХ.

Таблица 3.2.1 - 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 | температура, °С | 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 |

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.

Таким образом, 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 25,1 %.

На следующем этапе подбора оптимального режима CO₂-экстракции почек тополя бальзамического определяли влияние продолжительности экстрагирования на извлечение пиностробина (табл. 3.2.2).

Таблица 3.2.2 - Результаты изучения выхода экстракта и пиностробина из почек тополя бальзамического в зависимости от времени экстракции

| № эксперимента | Параметры экстрагирования | | | Выход экстракта | | Содержание пиностробина | |
|----------------|---------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-------------------------|-------------|
| | давление, МПа | температура, °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 3.2.3.

Таблица 3.2.3 - Динамика выхода экстракта и пиностробина в зависимости от температуры экстракции

| № эксперимента | Параметры экстрагирования | | | Выход экстракта | | Содержание пиностробина | |
|----------------|---------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-------------------------|-------------|
| | давление, МПа | температура, °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 |

В ходе эксперимента выявлено, что увеличение температуры экстракции с 50 до 60°С обеспечивает повышение выхода CO₂-экстракта и количественное содержание пиностробина в нем. Увеличение температуры экстракции с 65 до 70°С приводит к незначительному повышению выхода CO₂-экстракта, но при этом существенно снижается содержания пиностробина в нем.

Таблица 3.2.4 – Параметры оптимального режима CO₂-экстракции почек тополя бальзамического, обеспечивающего количественное извлечение пиностробина

| Режим экстракции | | | Выход CO ₂ -экстракта и количественное содержание пиностробина | | | | | | |
|------------------|-----------------|-------------|---|-----------------|-------|-------------------------------------|-------|--|------|
| давление, МПа | температура, °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, обеспечивающее количественное извлечение пиностробина из растительного сырья.

3.3. Разработка нового способа выделения и очистки пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического с применением современных хроматографических методов

Для разделения суммы флавоноидов обычно используют колоночную хроматографию на силикагеле, полиамидном сорбенте, сефадексе LH-20, целлюлозе. Элюирование веществ проводят с помощью хлороформа, а затем смеси хлороформа с метиловым или этиловым спиртами в градиентном режиме, то есть с возрастающей полярностью элюентной смеси (обычно в диапазоне концентраций спиртов 1-30 %). Для выделения индивидуальных флавоноидов используют рехроматографию, перекристаллизацию или специфические методы [111].

Ранее для наработки пиностробина применялись следующие способы:

– Воздушно-сухие почки тополя бальзамического, массой 400 г трехкратно экстрагировали на аппарате «Сокслет» 95 %-ным этиловым спиртом. Экстракты объединяли, фильтровали и упаривали на ротационном испарителе под вакуумом. Получили 100 г густой темно-желтой массы.

Полученный экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем марки КСК 0,31-0,63 мкм, используя в качестве элюентов смеси: 1) петролейный эфир, 2) петролейный эфир-бензол, 3) бензол-этилацетат в различных соотношениях.

Далее, идентичные по составу фракции объединяли и хроматографировали на флеш-колонке при соотношении массы фракции и адсорбента 1:50. Системы для флеш-хроматографии: петролейный эфир – бензол: 1) 7:3, 2) 9:1, и бензол-этилацетат: 3) 8:2, 4) 4:6.

В результате хроматографического разделения получают 11,2 г пиностробина. Выход пиностробина составляет 2,8 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [112].

Свежесобранные почки тополя бальзамического экстрагировали водным спиртом, полученный экстракт упаривали в вакууме до густого остатка и последовательно хроматографировали на различных сорбентах. При этом выделен пиностробин в виде кристаллов игольчатой формы [113].

Как видно из вышеизложенного, способы выделения и очистки пиностробина характеризуются многостадийностью, использованием дорогостоящих, легковоспламеняющихся, токсичных органических растворителей (бензол).

Основным недостатком технологии извлечения пиностробина из почек тополя бальзамического является хроматографическое разделение экстракта методом колоночной хроматографии, которая характеризуется низкой скоростью разделения, невысокой производительностью и значительной трудоемкостью, требуют применения твердых сорбентов и значительного количества токсичных органических растворителей. При этом наработка 60 г пиностробина занимала порядка 10 рабочих дней.

Поэтому разработка и внедрение в производство новой технологии получения пиностробина и сопутствующих флавоноидов из экстракта почек тополя бальзамического является актуальной задачей.

В последние годы для получения флавоноидов успешно применяют современные автоматизированные виды препаративной жидкостной хроматографии, а именно, центробежную хроматографию распределения и противоточную хроматографию, которые обеспечивают высокую скорость разделения, не требуют применения твердых сорбентов и дорогостоящих, токсичных элюентов.

Для разработки эффективного и экологически безопасного способа препаративной наработки пиностробина нами впервые проведена апробация

современных хроматографических методов, а именно, центробежной хроматографии распределения.

Центробежная хроматография распределения (СРС) - отличная альтернатива, чтобы избежать проблем, связанные с твердофазными адсорбентами и сохранить химическую целостность смесей, подвергаемых разделению. С учетом этих преимуществ она получает все большую популярность как инструмент очистки природных соединений, и особенно для разделения растительных экстрактов.

Поскольку основой успешного разделения с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) является правильным выбором хроматографической системы растворителей, работа начато с подбора оптимальной системы растворителей, которые обеспечат количественный выходы качественного целевого продукта.

Изначально проведен подбор системы растворителей для разделения на установке FCPC-A200 CO₂-экстракта почек тополя бальзамического, при этом использованы 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 CO₂-экстракта почек тополя бальзамического подобрана согласно коэффициенту распределения (K) пиностробина, между двумя не смешивающимися фазами. Значение K пиностробина оценивали по анализу методом ВЭЖХ. Оптимальной системой растворителей для выделения пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического определена смесь гексан:этилацетат:ацетонитрил:вода (6:4:5:4), в качестве подвижной фазы использован нижний слой системы.

Проведено экспериментальное разделение CO₂-экстракта почек тополя бальзамического на установке FCPC-A200 с использованием системы растворителей гексан:этилацетат:ацетонитрил:вода (6:4:5:4), разделение проводилось двойным методом: элюирование и экструзия, при этом получено 60 фракций.

Фракции, содержащие пиностробин (49-58) (по данным ТСХ) объединили и упарили, затем перекристаллизовали из гексана и получили пиностробин с чистотой 99,18 % по данным ВЭЖХ, выход составил 14,0 % в пересчете на массу экстракта почек тополя.

Экспериментально установлено, что оптимальным способом для выделения и очистки пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического, обеспечивающим количественный выход качественного целевого продукта, является центробежная хроматография распределения.

3.4. Разработка технологии субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения

Для повышения производительности, автоматизации, уменьшения продолжительности технологического процесса и исключения токсичных растворителей разработана эффективная, экономичная, экологически безопасная технология получения метоксилированного флавоноида пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения.

3.4.1. Подбор оптимальных условий выделения и очистки субстанции пиностробина

Выделение пиностробина из CO₂-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, скорость подачи подвижной фазы и скорость вращения ротора (рис.3.4.1.1.-3.4.1.4), проведен ряд экспериментов для определения оптимального режима разделения CO₂-экстракта почек тополя бальзамического, обеспечивающего количественный выход качественного целевого продукта - пиностробина.

Для определения оптимального количества CO₂-экстракта почек тополя бальзамического для одного разделения, в производственную установку FCPC-5000 вводили 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 г CO₂-экстракта, объем вводимой пробы составлял 700 мл.

При введении 10, 20, 30, 40, 50 г происходит эффективное разделение CO₂-экстракта, выход пиностробина в среднем 8 г, что составляет 16,0 % в пересчете на массу CO₂-экстракта почек тополя бальзамического. В ходе разделения проб, содержащих 60 и 70 г CO₂-экстракта, наблюдается уменьшение выхода целевого продукта до 4,7 г (7,8 %) и 4,2 г (6,0 %) соответственно, что связано со снижением разрешения хроматографического процесса, то есть ухудшением разделения компонентов смеси, вследствие введения в производственную установку FCPC-5000 слишком большого количества CO₂-экстракта (рис.3.4.1.1).

Для эффективного разделения компонентов и количественного выхода пиностробина необходимо полное растворение 50 г CO₂-экстракта почек тополя бальзамического в смеси подвижной фазы и стационарной фазы. Поскольку максимально возможный объем вводимой пробы составляет 800 мл, нами апробированы смеси стационарной фазы:подвижной фазы в объемном соотношении 100:600, 200:500, 300:500, 400:400, 500:300, 600:200, 700:100 и 800 мл стационарной фазы.

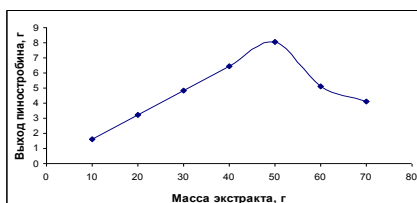


Рис. 3.4.1.1. Зависимость выхода пиностробина от массы вводимой пробы

В результате экспериментально установлено, что полное растворение пробы и количественный выход пиностробина (16 %) обеспечивает смесь, включающая 700 мл стационарной и 100 мл подвижной фазы. Применение других выше перечисленных смесей стационарной фазы и подвижной фазы приводит к неполному растворению CO_2 -экстракта, как следствие, к дополнительному фильтрованию пробы и снижению выхода пиностробина (рис. 3.4.1.2).

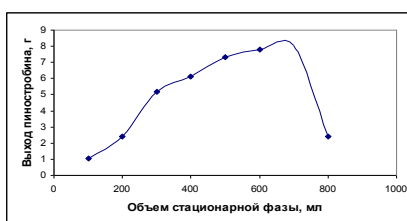


Рис. 3.4.1.2. Зависимость выхода пиностробина от объема стационарной фазы в пробе

Скорость подачи элюента значительно влияет на качество разделения смеси компонентов и продолжительность процесса. Поэтому нами приведено выделение пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического со скоростью подачи элюента 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 мл/мин (рис. 3.4.1.3).

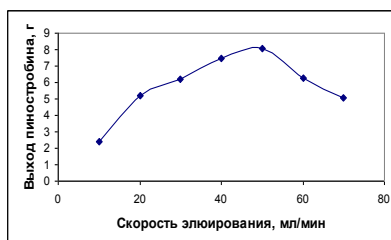


Рис. 3.4.1.3. Зависимость выхода пиностробина от скорости подачи подвижной фазы

Как видно из полученных данных, разделение со скоростью подачи элюента 10, 20, 30, 40 мл/мин занимает от 180 до 120 минут и значительно снижает выход пиностробина. Увеличение скорости подачи элюента до 60 и 70 мл/мин значительно сокращает продолжительность разделения до 70 минут, но и существенно снижает выход пиностробина. Количественный выход целевого продукта (16 %) достигается при скорости подачи элюента 50 мл/мин, при этом полное разделение вводимой пробы происходит в течение 90 мин.

Скорость вращения ротора оказывает существенное влияние на смешивание и разделение стационарной и подвижной фаз в ходе хроматографирования, то есть, значимо влияет на эффективность хроматографического процесса. Поэтому нами исследован количественный выход пиностробина при разделении CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического со скоростью вращения ротора 800, 900, 1000, 1100 и 1200 оборотов в минуту (рис. 3.4.1.4).

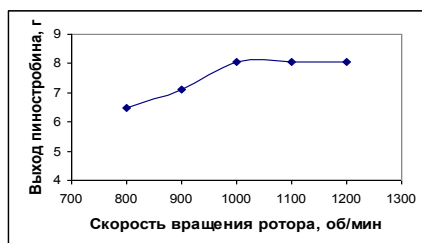


Рис. 3.4.1.4. Зависимость выхода пиностробина от скорости вращения ротора установки FCPC-5000

Разделение со скоростью вращения ротора 800 и 900 об./мин снижает выход пиностробина. Количественный выход целевого продукта (16 %) обеспечивает разделение CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического со скоростью вращения ротора 1000 оборотов в минуту. При скорости вращения ротора 1100 и 1200 об./мин в системе достигается максимальное давление и происходит автоматическое снижение скорости подачи элюента, за счет чего увеличивается время разделения и снижается выход пиностробина.

Таким образом, экспериментально установлено, что для выделения пиностробина из CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического оптимальными являются следующие условия хроматографирования: 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 почек тополя бальзамического (рис. 3.4.1.5). 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 % (рис.5).

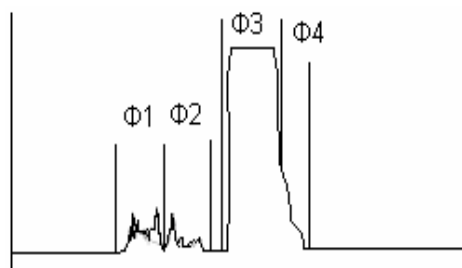


Рис. 3.4.1.5. Хроматограмма разделения CO_2 -экстракта почек тополя бальзамического с применением FCPC-5000

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 (2,8 % в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Сравнение основных показателей технологий субстанции пиностробина с использованием колоночной хроматографии и с

применением центробежной хроматографии распределения представлено в таблице 3.4.1.1.

Таблица 3.4.1.1 - Сравнение основных показателей технологии субстанции пиностробина с использованием колоночной хроматографии (КХ) и с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР)

| Показатели | КХ | ЦХР | Эффективность |
|---|---|--|--|
| Временные затраты | 20 рабочих дней | 20 рабочих дней | - |
| Производительность | 120 г (3 колонки по 250 г смолки) | 300 г | Увеличена в 2,5 раза |
| Выход продукта (в пересчете на СО ₂ -экстракт) | 15,5 % | 16,0 % | Увеличен в 1,03 раза |
| Сорбент | Силикагель марки КСК – 1,6 кг (используется однократно) | Не используется | Не используется |
| Расход растворителей | Петролейный эфир - 56 кг, этилацетат – 8 кг | Гептан – 8,4 кг, ацетонитрил – 6,4 кг, этилацетат – 9 кг, дистиллированная вода - 8 кг | Снижен в 2,7 раза; исключен дорогостоящий и огнеопасный петролейный эфир |
| Трудозатраты | 6 человек – 186 000 тг | 2 человека – 70 000 тг | Снижены в 3 раза |
| Себестоимость 1 г субстанции пиностробина | 2012 тенге | 150 тенге | Снижена в 3 раза |

Эффективность разработанной технологии, при увеличении производительности в 2,5 раза, с учетом снижения трудозатрат в 3 раза, позволила снизить себестоимость 1 г субстанции пиностробина в 3 раза.

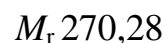
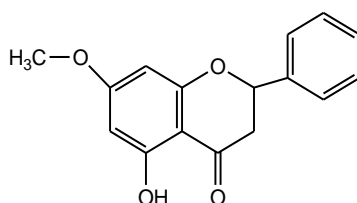
Таким образом, разработана эффективная, экономичная и экологически безопасная технология получения субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения, позволяющая нарабатывать в сутки до 40 г пиностробина с чистотой не менее 99,0 %.

3.5. Спецификация качества субстанции пиностробина

Поскольку необходим нормативный документ, регламентирующий качество субстанции пиностробина, разработан проект АНД, который составлен на основании результатов анализов 3 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК (табл. 3.5.1).

Спецификация качества включает в себя следующие показатели:

Определение: Пиностробин содержит не менее 98.0 % [5-гидрокси-7-метоксифлаванона]



Стандартный образец пиностробина предназначен для количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Таблица 3.5.1 – 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 (C-H связи ароматических групп), 2934 (O-CH ₃ при ароматической группе), 1650 (C=O), 1622, 1574 (C=C), 1343 (-CH ₃), 1317, 1255, 1155 (C-O-C), 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 |
| Температура плавления, °С | От 97 до 99 | 97 - 98 | 97 - 99 | 96 - 97 |
| 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 |
| 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 |

Свойства:

Описание. Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления. От 97°С до 99°С.

Растворимость. Растворим в хлороформе, эфире диэтиловом, этилацетате, ацетоне, мало растворим в 96 % этаноле, практически не растворим в воде.

Идентификация:

Инфракрасный спектр поглощения пиностробина, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 4000 см⁻¹ до 500 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3091, 3057 (С-Н связи ароматических групп), 2934 (О-СН₃ при ароматической группе), 1650 (С=О), 1622, 1574 (С=C), 1343 (-СН₃), 1317, 1255, 1155 (С-О-С), 1283, 1095, 890 см⁻¹ (бензольное кольцо).

Ультрафиолетовый спектр 0.0005 % раствора пиностробина в 95 % этаноле в области от 190 нм до 450 нм имеет максимум поглощения при длине волны 289 ± 2 нм и при 325 ± 2 нм (плечо).

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 (флавоноид).

Испытания:

Родственные примеси. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (2.2.29), используя метод внутренней нормализации.

Испытуемый раствор. 5.0 мг СО пиностробина растворяют в 10 мл ацетонитрила при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят тем же растворителем до объема 25.0 мл. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Раствор сравнения. 5.0 мг СО пиностробина и 0.05 мг СО тектохризина растворяют в 10 мл ацетонитрила при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят тем же растворителем до объема 25.0 мл. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Хроматографирование проводят на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в следующих условиях:

– колонка размером 4.6 x 150 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм (например, Zorbax SB-C18);

– подвижная фаза *ацетонитрил Р – вода Р - кислота уксусная Р* (50:49:1);

– скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин;

– температура колонки комнатная;

– детектирование при длине волны 289 нм.

Время хроматографирования 30 мин.

Хроматографируют 20 мкл раствора сравнения.

Время удерживания пиностробина 28,19 мин. Относительное время удерживания пика примеси тектохризина в стандартном образце около 30,80 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– коэффициент разделения пиков примеси тектохризина и пиностробина составляет не менее 1.15;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику пиностробина составляет не менее 3700 теоретических тарелок;

– относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площади пика пиностробина составляет не более 2 %;

– коэффициент симметрии пика пиностробина составляет не более 2.

Хроматографируют 20 мкл испытуемого раствора.

Содержание суммы примесей (X) в стандартном образце, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{\sum S_i}{\sum S_i + S_0} \cdot 100 \%$$

где: S_i – сумма площадей пиков всех примесей на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика пиностробина на хроматограмме испытуемого раствора.

Не учитывают пики растворителей.

Сумма примесей не должна превышать 1.0 %.

Этилацетат. Не более 0.5 % (м/м). Определение проводят методом газовой хроматографии (2.2.28).

Раствор внутреннего стандарта. 0.5 мл углерода тетрахлорида *P* доводят этанолом *P* до объема 100.0 мл.

Испытуемый раствор. Около 150 мг (точная навеска) стандартного образца пиностробина растворяют в 3 мл раствора внутреннего стандарта.

Раствор сравнения. По 0.5 мл этилацетата *P* и углерода тетрахлорида *P* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят этанолом *P* до объема 100.0 мл и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка капиллярная, размером 30 м x 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана (5:95) толщиной 0.25 мм;
- газ-носитель *аргон для хроматографии P*, скорость 20 мл /мин;
- скорость водорода 40 мл /мин;
- скорость воздуха 400 мл /мин;
- температура колонки 30 °С;
- температура детектора 120 °С;
- температура испарителя 100 °С.

Хроматографируют 0,2 мкл раствора сравнения.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этилацетата составляет не менее 30000 теоретических тарелок;
- коэффициент симметрии пика этилацетата составляет не более 2 %;

– относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика этилацетата составляет не более 2 %.

Хроматографируют 0,2 мкл испытуемого раствора.

Содержание этилацетата в стандартном образце в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S_{on} \cdot f}{S_{In} \cdot S_0 \cdot m},$$

где: S_1 – площадь пика этилацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

S_{In} – площадь пика внутреннего стандарта (углерода тетрахлорида) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_{on} – площадь пиков внутреннего стандарта (углерода тетрахлорида), на хроматограмме раствора сравнения;

S_0 – площадь пика этилацетата на хроматограмме раствора сравнения;

m – масса навески стандартного образца в миллиграммах;

V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;

p – плотность этилацетата;

P – содержание этилацетата в образце этилацетата в процентах;

3 – разведение;

f – фактор пересчета, равный

$$f = \frac{V_0 \cdot p \cdot 3 \cdot P}{100}$$

Содержание $C_4H_8O_2$ (этилацетата) в стандартном образце пиностробина должно быть не более 0,5 %.

Количественное определение. Содержание пиностробина в стандартном образце пиностробина (X), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X = 100 \% - X_1 - X_2 - X_3;$$

где: X_1 – содержание суммы примесей в процентах;

X_2 – содержание воды в процентах;

X_3 – содержание этанола в процентах.

Вода (2.5.12). Не более 0.5 %. Определение проводят из 0.150 г стандартного образца пиностробина.

Микробиологическая чистота: определение микробиологической чистоты исследуемых образцов субстанции пиностробина проведено в соответствии с требованиями ГФ XI, вып.2, с.193, изменение № 3, категория 1. 2 Б. Субстанция в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В 1 г субстанции допускается наличие не более 1000 бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Не допускается наличие *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Наличие бактерий, дрожжевых и плесневых грибов в субстанции пиностробина не установлено.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С.

Для введения пиностробина в Государственную фармакопею в качестве стандартного образца предназначенного для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах сформировано досье и представлено в РГП на ПХФ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники», в которое включены следующие разделы:

- 1 Спецификация качества стандартного образца пиностробина;
- 2 Валидация методики определения родственных примесей;
- 3 Сведения о лекарственном растительном сырье почек тополя бальзамического;
- 4 Валидация методики количественного определения пиностробина в почках тополя бальзамического;
- 5 Технологическая схема получения пиностробина;
- 6 Производственная формула;
- 7 Валидация технологического процесса получения пиностробина;

8 Установление строения пиностробина;

9 Проект АНД. Пиностробин – стандартный образец.

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 лекарственных растительных препаратах.

3.6 Разработка опытно-промышленного регламента получения субстанции пиностробина

Разработан и утвержден лабораторный регламент получения субстанции пиностробина и на его основе разработан опытно-промышленный регламент.

В опытно-промышленный регламент входят следующие разделы:

- 1) Характеристика конечной продукции производства
- 2) Технологическая схема производства
- 3) Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования
- 4) Характеристика сырья, материалов и полуфабрикатов
- 5) Изложение технологического процесса
- 6) Материальный баланс
- 7) Переработка и обезвреживание отходов производства
- 8) Контроль производства и управление технологическим процессом
- 9) Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария

Основные стадии технологической схемы получения пиностробина из экстракта почек тополя бальзамического с применением центробежной хроматографии распределения на рисунке 3.6.1.

Технологическая схема получения пиностробина

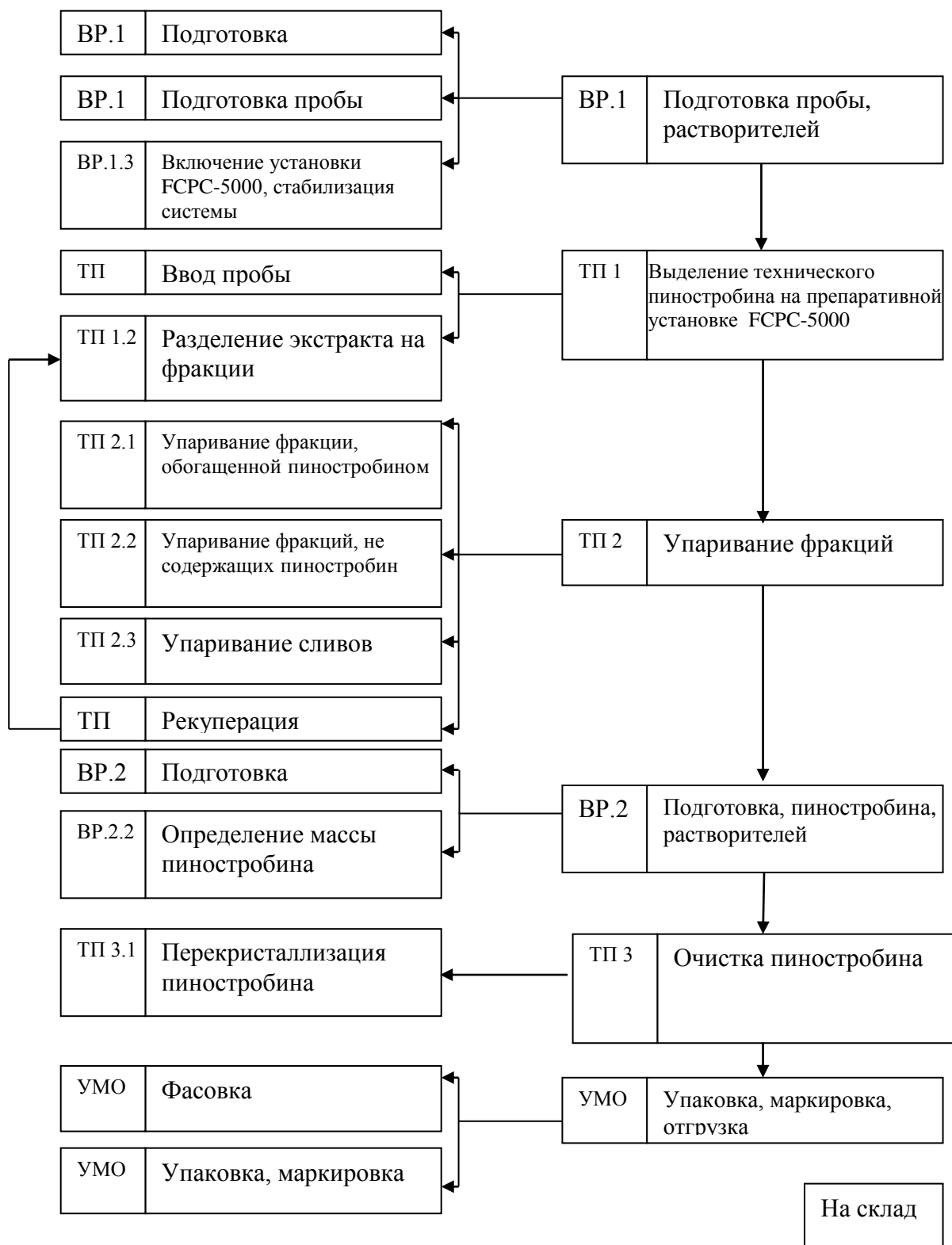


Рис. 3.6.1. Основные стадии технологического процесса производства субстанции пиностробина

**Изложение технологического процесса производства субстанции
VR.1 - Подготовка пробы, растворителей**

ВР 1.1 Подготовка растворителей

Для подготовки стационарной фазы (СФ) и подвижной фазы (ПФ) для хроматографического разделения на установке FCPC-5000 отмеряют мерным цилиндром 5,4 кг гексана, 6,0 кг этанола и 5,4 кг этилацетата, 6,0 кг дистиллированной воды смешивают в делительной воронке подходящего объема, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин и оставляют на 40 мин расслаиваться. Далее сливают нижний слой (подвижная фаза) 13,2 кг и верхний слой (стационарная фаза) 9,6 кг, передают на ТП.1.

ВР 1.2 Подготовка пробы

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г) 50,0 г (точная навеска) экстракта почек тополя бальзамического, затем количественно переносят в химический стакан объемом 1,0 л и растворяют в 800 мл смеси стационарной и подвижной фаз и передают на ТП 1.

ВР 1.3 Включение установки FCPC-5000 и стабилизация системы

Включают термостат ротора FCPC-5000, насос, детектор, фракционный коллектор, коммуникатор и компьютер установки FCPC-5000. Открывают программу ReSponder и активируют метод для промывки системы. Вентиль направления потока переключают в положение промывки, т.е. минуя ротор установки, и поочередно прокачивают коммуникации стационарной фазой, подвижной фазой и пробой соответственно для удаления воздуха в течение 5 минут со скоростью 100 мл/мин. По окончании заполнения коммуникаций вентиль направления потока переключают в рабочее положение.

Стационарная фаза закачивается в ротор при помощи насоса установки со скоростью 100 мл/мин при скорости вращения ротора 500 оборотов в минуту. Время заполнения/промывки ротора 50 минут.

Стабилизация системы установки FCPC-5000 проводится при подаче подвижной фазы в ротор с помощью насоса со скоростью 100 мл/мин, при скорости вращения ротора 1000 оборотов в минуту. Время стабилизации

системы 10-15 минут. После чего установка FCPC-5000 готова для хроматографического разделения (ТП.1).

ВР.2 - Подготовка пиностробина, растворителя

ВР 2.1 Определение объема растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,4 л гексана и передают на ТП 3.1

ВР 2.2 Определение массы технического пиностробина

Взвешивают на весах общего назначения 30,0 г (точная навеска) пиностробина технического и передают на ТП 3.1.

ТП.1 - Выделение технического пиностробина на препаративной установке FCPC

Активируют метод хроматографического разделения, который включает в себя: 1) эквilibровку (6 минут со скоростью подачи мобильной фазы 10 мл/мин, запуск вращения ротора до скорости 1000 оборотов в минуту), 2) ввод пробы (8 минут со скоростью 100 мл/мин) и 3) разделение пробы на фракции (50 минут со скоростью подачи мобильной фазы 50 мл/мин, скорость вращения ротора 1000 оборотов в минуту), 4) экструзия – смена местами подвижной и стационарной фаз (40 минут со скоростью подачи подвижной фазы 100 мл/мин).

ТП 1.1 Ввод пробы

Проба закачивается в ротор при помощи насоса установки FCPC со скоростью 100 мл/мин в течение 8 минут. Объем вводимой пробы 800 мл.

ТП 1.2 Разделение пробы на фракции

Разделение проводится при скорости подачи мобильной фазы 50 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 оборотов/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 90 минут. УФ-детектирование при 289 нм.

Отбор фракций проводится при помощи фракционного коллектора, переключением вентилей направления потока, согласно получаемой хроматограмме: при появлении первого пика (через 15-20 мин) собирают первую фракцию в течение 15 минут, затем собирают вторую фракцию в

течение 20 минут, при выходе пика пиностробина собирают третью фракцию в течение 5 минут, затем собирают четвертую фракцию до окончания выхода пробы (показание детектора 0-2 AU). Таким образом, в результате разделения получают 4 фракции объемом от 250 до 1000 мл.

По окончании разделения скорость подачи мобильной фазы снижаем до 10 мл/мин и выключаем ротор, после его полной остановки отключаем насос.

В день проводят 5 разделений.

Фракции, обогащенные пиностробином, передаются на ТП 2.1.

Фракции, не содержащие пиностробина, передаются на ТП 2.2.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.1), а именно, на разделение 9,0 кг экстракта почек тополя бальзамического с применением установки ФСРС, составляют 36 рабочих дней.

ТП.2 – Упаривание фракций

ТП 2.1 Упаривание фракций, обогащенных пиностробином

Фракции, обогащенные пиностробином (фракции № 3), упариваются на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном. После отгона растворителя получаем кристаллический остаток (пиностробин технический) массой 1,44 кг, который передается на перекристаллизацию (ТП.4).

ТП 2.2 Упаривание фракций, не содержащих пиностробин

Фракции, не содержащие пиностробина, упариваются на ротационном испарителе Pilotvar или аналогичном. Отдельно собирают остатки фракции № 1, фракции № 2, фракции № 4 и передают для анализа на наличие пиностробина.

Качественный анализ фракций проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈ 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода - уксусная кислота в соотношении 50:49:1;

- детектирование при длине волны 289 нм;
- температура колонки – 20 °С;
- скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили за счет программного обеспечения ChemStation.

ТП 2.3 Упаривание сливов

Сливы стационарной и мобильной фазы упаривают на ротационном испарителе Pilotvar или аналогичном. Остаток передают для анализа на наличие пиностробина. Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы передают на ТП 2.4.

Качественный анализ сухого остатка проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈ 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода - уксусная кислота в соотношении 50:49:1;
- детектирование при длине волны 289 нм;
- температура колонки – 20 °С;
- скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили за счет программного обеспечения ChemStation.

ТП 2.4 Рекуперация растворителей

Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы заливают в делительную воронку объемом 25 л, тщательно встряхивают в течение 5 минут и отстаивают в течение 1 часа. Далее стационарную и мобильную фазы разделяют и передают на ТП.1.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.2), а именно, на сгущение фракций и рекуперацию растворителей после

разделения 9,0 кг экстракта почек тополя бальзамического с применением препаративной установки ФСРС, составляет 36 рабочих дней.

ТП. 3 Очистка продуктов

ТП 3.1 Растворение, кристаллизация. Сушка очищенного пиностробина

Пиностробин технический, полученный на стадии ТП 2.1, подвергают перекристаллизации. Испарительную колбу со 30 г пиностробина технического устанавливают на водяную баню при температуре 50-60 °С и растворяют в 400 мл гексана. Гексан добавляют постепенно до момента полного растворения пиностробина. Чтобы снизить потери, используют обратный холодильник.

После полного растворения пиностробина колбу снимают с водяной бани и постепенно охлаждают (сначала при комнатной температуре 1 час, затем в холодильнике при 2-5 °С – 1 час). При этом в колбе постепенно начинают выпадать кристаллы пиностробина игольчатой формы.

Пиностробин сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С и давлении –0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы. Пиностробин должен иметь вид игловидных кристаллов белого цвета без запаха.

Температуру плавления определяют в открытом капилляре на приборе для определения температуры плавления (ПТП).

Качественный анализ субстанции пиностробина проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈ 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода - уксусная кислота в соотношении 50:49:1;
- детектирование при длине волны 289 нм;
- температура колонки – 20 °С;
- скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин;

- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили за счет программного обеспечения ChemStation.

Время удерживания пиностробина: $29,4 \pm 1,0$ мин.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.3.1), а именно, на получение 1,0 кг субстанции пиностробина с чистотой не менее 99,0 % составляют 36 рабочих дней.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка пиностробина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Затем препарат передают на склад.

Аппаратурная схема производства субстанции пиностробина представлена на рисунке 3.6.2.

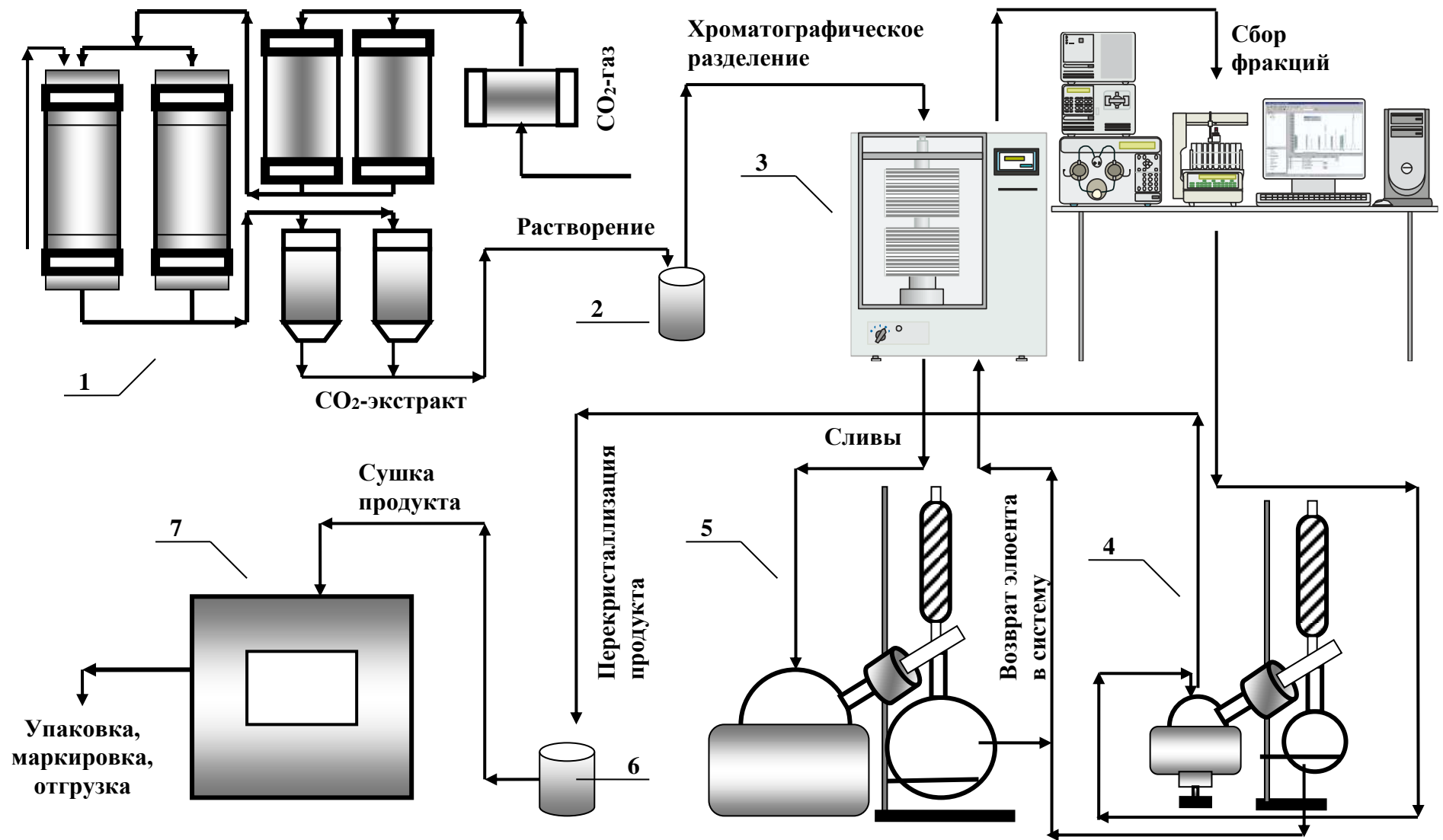


Рисунок 3.6.2. Аппаратурная схема производства субстанции пиностробина

Заключение по 3 главе

Впервые для выделения и очистки флавоноида пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического использована центробежная хроматография распределения.

В результате проведенных экспериментальных работ определены оптимальные параметры режима экстракции почек тополя бальзамического с использованием CO₂-газа в сверхкритическом состоянии: давление 20 МПа, температура 60°C, продолжительность экстракции 180 минут. Полнота извлечения пиностробина в данном режиме составила 91,0 %, выход CO₂-экстракта – 16,6 % (33,2 г) с содержанием пиностробина – 25,1 % (8,33 г) по данным ВЭЖХ. Остаточное содержание пиностробина в шроте - 0,41 % (0,81 г)

Оптимальной системой растворителей для выделения пиностробина из CO₂-экстракта почек тополя бальзамического определена смесь гексан:этилацетат:ацетонитрил:вода (6:4:5:4), в качестве подвижной фазы использован нижний слой системы.

На основании проведенных исследований, впервые разработана технология получения субстанции пиностробина с применением центробежной хроматографии распределения, определены параметры, обеспечивающие количественный выход качественного целевого продукта. Разработан и утвержден лабораторный (Приложение А) и опытно-промышленный регламент на производство субстанции пиностробина пиностробина (Приложение Б).

Пиностробин включен в качестве стандартного образца в Государственную Фармакопею Республики Казахстан (ГФ РК, Т. III., 2014, С. 123-126) (Приложение В).

ГЛАВА 4

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА

4.1. Подбор оптимальных условий оксимирования пиностробина

Как известно, при помощи химической модификации можно получить биологически активные вещества или повысить активность исходного соединения. Поэтому на основе пиностробина проведен ряд химических превращений, для получения новых биологически активных веществ на его основе [115-120].

Взаимодействием пиностробина (40) с гидросиламином солянокислым в этиловом спирте с добавлением натрия гидрокарбоната получили оксим пиностробина (41) (рис. 4.1.1.), который обладает выраженным гепатопротекторным действием, преобладающим над аналогичной активностью пиностробина и суммы экстрактивных веществ почек тополя бальзамического [121].

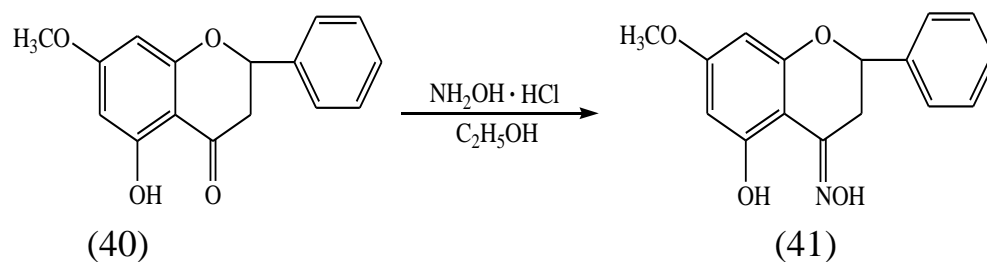


Рис. 4.1.1. Химическая схема производства субстанции оксима пиностробина.

Произведен подбор оптимальных условий для проведения синтеза оксима пиностробина, который обеспечит количественный выход целевого продукта. В ходе экспериментов реакцию оксимирования проводили на 30 г пиностробина при 60°C, при этом варьировали объемом этанола, количеством гидросиламина солянокислого, а также изменяли время

синтеза. Зависимость количественного выхода оксима пиностробина от условий проведения реакций представлена в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Зависимость выхода оксима пиностробина от условий синтеза при температуре 60 °С (количество пиностробина – 30 г)

| Объем этанола, мл | Гидроксиламин солянокислый, г | Натрия гидрокарбонат, г | Продолжительность синтеза, ч | Выход оксима пиностробина, г (%) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 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) |

Как видно из результатов таблицы 4.1.1, основными факторами, влияющими на количественный выход оксима пиностробина, являются объем этанола, избыточное количество реагента гидроксиламина солянокислого и продолжительность реакции. Взаимодействием 30 г пиностробина (40) с 15 г гидроксиламина солянокислого в 250 мл этилового спирта с добавлением 15 г натрия гидрокарбоната в течение 72 часов, при 60 °С, получили 31,4 г оксима пиностробина (41). Выход оксима пиностробина составил 98 %, с чистотой не менее 99 % по данным ВЭЖХ.

Ранее оксим пиностробина согласно утвержденной методики получали взаимодействием пиностробина с солянокислым гидроксиламином в среде этилового спирта в течение 24 часов при температуре 60°С. Данный метод позволял получить оксим пиностробина с сравнительно низким выходом (56%), кроме того при обработке реакционной смеси использовалась соляная кислота, что привело к сильному загрязнению конечного продукта, и затруднениям в последующей очистке, а также его потерям. Также проведенные эксперименты показали, что применение методики обработки реакционной смеси соляной кислотой с последующим экстракционным извлечением конечного продукта этилацетатом приводит к

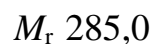
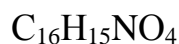
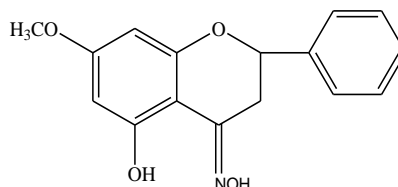
его сильному загрязнению, и затруднениям в последующей очистке, а также потерям оксима пиностробина. Поэтому разработана эффективная, экономичная, экологически безопасная технология производства субстанции оксима пиностробина, позволяющая увеличить выход целевого продукта в 1,75 раза (с 56% до 98%) с чистотой не менее 99%, при этом исключена стадия обработки реакционной смеси соляной кислотой и достигнуто повышение производительности труда.

Таким образом, нами подобраны оптимальные условия оксимирования пиностробина, обеспечивающие выход оксима пиностробина 98%, с чистотой не менее 99 %.

4.2. Оценка качества субстанции оксима пиностробина

На основании результатов анализов 3 серий разработан проект АНД на субстанцию оксима пиностробина, который составлен в соответствии с требованиями ГФ РК (Приложение Г).

Спецификация качества включает в себя следующие показатели:



Свойства:

Описание: Кристаллический порошок от белого до белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.

Температура плавления: От 182 °С до 184 °С (ГФ РК I, т. 1).

Растворимость: Растворим 95% спирте, этилацетате, ацетоне, практически не растворим в воде. (ГФ РК I, т. 1, 1.4).

Идентификация:

А. Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области

от 3800 до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические 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.

Б. Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн 280±2 нм.

В. 0.02 г субстанции растворяют в 5 мл 70 % спирта Р и фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл полученного раствора прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной Р, 0.01-0.02 г магния Р (порошок или стружка) и нагревают на водяной бане в течение 5 мин; постепенно появляется красное окрашивание (флавоноиды).

Испытания:

Потеря в массе при высушивании. Не более 5.0 % (ГФ РК I, т. 1, 2.2.32.). 0.500 г субстанции сушат при температуре (102.5 ± 2.5)°С до постоянной массы.

Тяжелые металлы: Не более 0.01 % в субстанции (ГФ РК, т. 2).

Посторонние примеси: По 20 мкл испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в условиях, описанных в разделе «Количественное определение» (ГФ РК I, т.1, 2.2.29).

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей всех дополнительных пиков, кроме основного не должна превышать 2.0%.

Микробиологическая чистота: Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК, т. 2, 2.6.13.

Субстанция в условиях испытания не обладает антимикробным действием.

Субстанция должна соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4. категория 3В.

В 1 г субстанции допускается наличие не более 10000 аэробных бактерий, 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), 100

энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий.

В 10 г субстанции не допускается наличие *Salmonella*, в 1 г субстанции - *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Остаточные количества органических растворителей (этилацетат).
Определение проводят методом газовой хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.28).

Испытуемый раствор: 150.0 мг субстанции растворяют в 3 мл раствора внутреннего стандарта.

Раствор сравнения: По 0.5 мл *этилацетата Р* и *углерода тетраоксида Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 96 % *спирте этиловом Р* до метки и перемешивают.

Раствор внутреннего стандарта: 0.5 мл *углерода тетраоксида Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 96% *спирте этиловом Р* до метки и перемешивают.

По 0.2 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка капиллярная, размером 30 м x 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил - диметилполисилоксана (5:95) толщиной 0.25 мм;
- газ-носитель: *аргон для хроматографии Р*, скорость 20 мл /мин;
- скорость водорода 40 мл /мин;
- скорость воздуха 400 мл /мин;
- температура колонки 30°C;
- температура детектора 120 °С;
- температура испарителя 100 °С.

Содержание этилацетата (X) в субстанции в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S_{on} \cdot f}{S_{1n} \cdot S_0 \cdot m},$$

где: S_1 – площадь пика этилацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

S_{1n} – площадь пика внутреннего стандарта (углерода тетрахлорида) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_{on} – площадь пиков внутреннего стандарта (углерода тетрахлорида), на хроматограмме раствора сравнения;

S_0 – площадь пика этилацетата на хроматограмме раствора сравнения;

m – масса навески субстанции в миллиграммах;

V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;

p – плотность этилацетата;

P – содержание этилацетата в образце этилацетата в процентах;

3 – разведение;

f – фактор пересчета, равный

$$f = \frac{V_0 \cdot p \cdot 3 \cdot P}{100},$$

Содержание $C_4H_8O_2$ (этилацетата) в субстанции пиностробина должно быть не более 0,5 %.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этилацетата на хроматограмме раствора сравнения, должно быть не менее 30000 теоретических тарелок;

- коэффициент симметрии пика, рассчитанный по пику этилацетата на хроматограмме раствора сравнения, должен быть не более 2 %;

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика этилацетата на хроматограмме раствора сравнения, должно быть не более 2 %.

Количественное определение. Определение проводят методом жидкостной хроматографии - ВЭЖХ (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29).

Испытуемый раствор: Около 5 мг (точная навеска) оксима пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл ацетонитрила, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки и перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения: 1.0 мг РСО оксима пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером 4,6 x 150 мм, заполненная «Zorbax SB-C₁₈» с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил - кислота уксусная (50:50), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы - 1,0 мл/мин;
- детектирование при длине волны 289 нм;
- температура колонки - 20° С;

Содержание оксима пиностробина в процентах (X), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1},$$

где S₁—среднее значение площадей пика оксима пиностробина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S₀— среднее значение суммы площадей всех пиков, кроме пиков растворителя, вычисленное из испытуемого раствора;

m₁ — масса навески субстанции, в миллиграммах;

m₀ — масса навески РСО оксима пиностробина, в миллиграммах;

P – содержание оксима пиностробина в СО оксима пиностробина, в процентах;

Содержание оксима пиностробина должно быть не менее 97,0 %.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику оксима пиностробина на хроматограммах раствора сравнения, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;

- относительно стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика оксима пиностробина на хроматограммах раствора сравнения, должна быть не более 2.0 %.

Хранение: В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 30 °С. Срок годности: 2 года.

Результаты исследования показателей качества субстанции оксима пиностробина представлены в табл. 4.2.1.

Таблица 4.2.1 – Показатели качества субстанции оксима пиностробина

| Наименование показателей | По проекту АНД | Результаты | | |
|--------------------------|---|---------------|---------------|---------------|
| | | 011115 | 021115 | 031115 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Описание | Кристаллический порошок от белого до белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха | 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 должен иметь максимумы поглощения при длинах волн 280±2 нм. | Соответствует | Соответствует | Соответствует |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|
| Растворимость | Растворим 95 % спирте, этилацетате, ацетоне, практически не растворим в воде | Соответствует | Соответствует | Соответствует |
| 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.

4.3 Разработка опытно-промышленного регламента получения субстанции оксима пиностробина

На основании полученных результатов разработана технология получения субстанции оксима пиностробина которая включает в себя два этапа: оксимирование пиностробина и перекристаллизацию готового продукта – оксима пиностробина.

Технологическая схема производства субстанции оксима пиностробина представлена на рисунке 4.3.1.



Рис.4.3.1. Технологическая схема производства субстанции оксима пиностробина

Изложение технологического процесса:

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка пиностробина, растворителя и реагентов

ВР 1.1 Определение массы пиностробина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2.1 кг, цена деления 0.01 г) 30,0 г (точная навеска) пиностробина и передают на ТП 1.1.

ВР 1.2 Определение объема растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,250 л спирта этилового и передают на ТП 1.1.

ВР 1.3 Определение массы гидроксиламина солянокислого

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2.1 кг, цена деления 0.01 г) 15,0 г (точная навеска) гидроксиламина солянокислого и передают на ТП 1.1.

ВР 1.4 Определение массы гидрокарбоната натрия

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2.1 кг, цена деления 0.01 г) 15,0 г (точная навеска) натрия гидрокарбоната и передают на ТП 1.1.

ТП.1 - Синтез оксима пиностробина

ТП 1.1 Растворение пиностробина и гидроксиламина солянокислого

30 г пиностробина и 15,0 г гидроксиламина солянокислого растворяют при 50-60 °С в 0,250 л спирта этилового и передают на ТП 1.3.

ТП 1.2 Добавление натрия гидрокарбоната

К спиртовому раствору пиностробина и гидроксиламина солянокислого присыпают 15,0 г гидрокарбоната натрия. Реакционную смесь передают на ТП 1.3.

ТП 1.3 Оксимирование пиностробина

Реакционную смесь перемешивают при 50-60 °С в течение 72 часов. Ход реакции контролируют с применением ТСХ. По завершении реакции смесь передают на ТП 2.1.

ТП.2 - Получение оксима пиностробина

ТП 2.1 Обработка реакционной смеси

По окончании синтеза отделяли выпавший продукт декантацией, трижды промывают этанолом, затем подвергают дальнейшей перекристаллизации из этанола, а затем из этилацетата.

ТП 2.2 Упаривание растворителя

Этилацетатный раствор заливают в колбу роторного испарителя ИКА RV 05 basic. В роторном испарителе проводится упаривание растворителя и получение технического оксима пиностробина. Процесс проводят при температуре 60 °С. Технический оксим пиностробина поступает на ТП 3.

ТП.3 - Кристаллизация оксима пиностробина

ТП 3.1 Перекристаллизация оксима пиностробина

Оксим пиностробина технический растворяют при нагревании до 50-60 °С в спирте этиловом 96 %, оставляют постоять 12 часов в холодном месте для кристаллизации. Затем растворитель отделяют от кристаллов декантацией. Растворитель утилизируют, а оксим пиностробина кристаллический передают на ТП 3.2.

ТП 3.2 Сушка и взвешивание продукта

После кристаллизации оксим пиностробина сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат его в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С и давлении –0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы. Оксим пиностробина должен иметь вид кристаллического порошка белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.

Температуру плавления определяют на приборе для определения температуры плавления, которая составляет 182-184 °С (из этилацетата).

Чистота и подлинность полученного оксима пиностробина очищенного определяется методом ВЭЖХ. Чистота оксима пиностробина очищенного должна составлять не менее 98,0 %.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки:

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции оксима пиностробина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Затем препарат передают на склад.

Заключение по 4 главе

Проведена реакция оксимирования на основе молекулы пиностробина. Основными факторами, влияющими на количественный выход оксима пиностробина, являются объем этанола, избыточное количество реагента гидроксиламина солянокислого и продолжительность реакции. Выход оксима пиностробина составил 98 %, с чистотой не менее 99 % по данным ВЭЖХ.

По результатам исследования разработана спецификация качества субстанции оксима пиностробина.

Таким образом, впервые разработана технология получения субстанции оксима пиностробина, которая включает в себя два этапа: оксимирование пиностробина и перекристаллизацию готового продукта – оксима пиностробина. Разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции оксима пиностробина (ОПР ФД650050337Р-04-16) (Приложение Д).

ГЛАВА 5

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ КАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА

В отечественной и зарубежной практике при разработке лекарственных препаратов определяющее значение имеет выбор рациональной лекарственной формы. Оптимально подобранные лекарственные формы позволяют максимально использовать лечебное действие препаратов при минимальных побочных эффектах. Лекарственная форма является основной структурной единицей современной фармакотерапии, и ей по праву отводится первостепенная роль. Общеизвестно, что скорость и продолжительность терапевтического действия лекарственного препарата 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 лекарственного препарата.

5.1. Разработка состава и технологии капсулированной формы на основе оксима пиностробина

В холдинге «Фитохимия» проводятся работы по разработке лекарственных форм на основе оксима пиностробина [122-128].

Для разработки технологии, позволяющей получить капсулы с оксимом пиностробина, подобран состав трех модельных композиции (табл. 5.1.1). Используются 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, поллоксамер для улучшения растворения труднорастворимых субстанций, а в качестве солюбилизатора применили натрия лаурилсульфат.

Таблица 5.1.1 - 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 | - |
| Поллоксамер 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 |

Технология приготовления модельных смесей для капсул с оксимом пиностробина по 50 мг:

Для улучшения технологических свойств и обеспечения однородности дозирования капсул оксима пиностробина введена стадия влажного гранулирования, оптимизировано количество скользящих веществ.

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 составило 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 солилизатора 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. Результаты определения технологических параметров гранул оксима пиностробина (табл. 5.1.2).

Таблица 5.1.2 - 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 проведен 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 серий опытных образцов капсул оксима пиностробина провели определение показателя распадаемости

полученных капсул. Результаты исследования оценки качества капсул оксима пиностробина в дозе 50 мг представлена в таблице 5.1.3

Таблица 5.1.3 - Показатели качества капсул оксима пиностробина 50 мг

| № модельной смеси | m _{ср} , мг | -Δ m, % | +Δ 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 экспериментальных исследований определена показатель средняя масса, однородность дозирования капсул оксима пиностробина, распадеаемость и определение количественного содержания действующего вещества.

На основе изучения технологических свойств капсулируемой массы установлен оптимальный состав гранул для капсулирования оксима пиностробина, который приведен в таблице 5.1.4.

Таблица 5.1.4 - Оптимальный состав гранул оксима пиностробиа с массой содержимого 0,2 г

| Наименование компонентов | Содержание компонентов на одну капсулу, г |
|---------------------------------|---|
| Оксим пиностробина | 0,0500 |
| Лактоза | 0,0510 |
| Крахмал | 0,0410 |
| Поливинилпирролидон | 0,0080 |
| Полоксамер Kolliphor P188 micro | 0,0308 |
| Кальция стеарат | 0,0002 |
| Натрия лаурилсульфат | 0,020 |
| Спирт этиловый | q.s. |
| Итого | 0,2000 |

При стандартизации капсул возникает необходимость изучения высвобождения активной субстанции из лекарственной формы. Проведена биофармацевтическая оценка предлагаемой лекарственной формы. Использовали методику *in vitro* – тест «Растворения», метод вращающейся корзинки. Исследуемым объектом служили капсулы модели №1.

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.

Одну капсулу оксима пиностробина помещали в корзинку, включали прибор и проводили испытание. В процессе исследования через каждые 10 минут в течении 60 минут отбирали по 25 мл пробы. Полученный исследуемый раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2-3 мл фильтрата.

10 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивали.

Полученный фильтрат хроматографировали на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series (Hewlett Packard) с УФ-детектором в условиях:

- колонка размером 4.6 x 150 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм (например, Zorbax SB-C₁₈);
- подвижная фаза ацетонитрил – кислота уксусная 1% (50:50);
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- температура колонки комнатная;
- детектирование при длине волны 279 нм.

Время хроматографирования 30 мин.

Содержание оксима пиностробина в одной капсуле (X) в миллиграммах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 500 \cdot 10 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot a}$$

S_1 – среднее значение площадей пиков оксима пиностробина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 - среднее значение площадей пиков оксима пиностробина, вычисленное из хроматограмм СО оксима пиностробина;

a - масса навески препарата в миллиграммах;

m_0 - масса навески СО оксима пиностробина в миллиграммах;

P – содержание оксима пиностробина в СО оксима пиностробина в процентах.

Результаты исследования капсул оксима пиностробина по тесту «Растворение» представлены в таблице 5.1.5 и на рисунке 5.1.5.

Таблица 5.1.5 - Высвобождение оксима пиностробина из капсул

| Время отбора пробы, мин | Количество высвободившегося оксима пиностробина | |
|-------------------------|---|------|
| | г | % |
| 1 | 0,0055 | 10,8 |
| 5 | 0,0106 | 19,7 |
| 10 | 0,0159 | 30,7 |
| 15 | 0,0221 | 44,6 |
| 20 | 0,0269 | 52,2 |
| 25 | 0,0371 | 64,7 |
| 30 | 0,0378 | 76,8 |
| 35 | 0,0428 | 79,9 |
| 40 | 0,0431 | 84,1 |
| 45 | 0,0434 | 86,3 |
| 60 | 0,0439 | 86,7 |

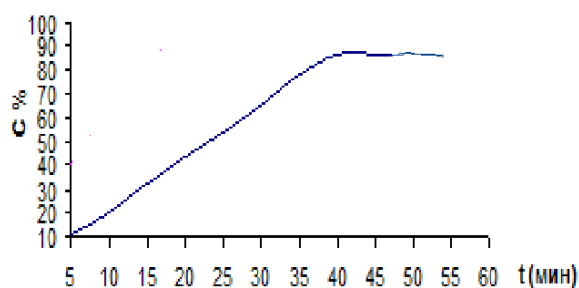


Рис. 5.1.1. Скорость высвобождения оксима пиностробина из капсул

Оксим пиностробина высвобождается 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.

5.2. Оценка качества капсулированной формы оксима пиностробина 50 мг

С учетом физико-химических свойств и в соответствии с требованиями нормативных документов, разработана спецификация качества на капсулы оксима пиностробина 50 мг. Результаты исследования образцов капсул «Оксима пиностробина» приведены в таблице 5.2.1.

Таблица 5.2.1 – Показатели качества опытных образцов капсул «Оксима пиностробина»

| Наименование показателей | По проекту АНД | Результаты | | |
|--------------------------|--|---------------|---------------|---------------|
| | | 010316 | 020316 | 030316 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Описание | Твердые капсулы желудочнорастворимые капсулы размером № 2, наполненные порошком от белого до белого с желтоватым оттенком цвета. | Соответствует | Соответствует | Соответствует |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| Средняя масса капсул, г | 0,2 | 0,2015 | 0,2007 | 0,2014 |
| Потеря в массе при высушивании | Не более 5.0 % | 3,12 | 3,28 | 2,88 |
| Отклонение от средней массы, % | ±10 | +2,2 – 1,0 | +2,7 – 1,6 | +3,0 - 1,4 |
| Распадаемость | Не более 20 мин. | 6 мин 45 сек. | 5 мин 15 сек. | 5 мин 10 сек. |
| Растворение, % | Не менее 75% | 86 | 84 | 86 |
| Количественное определение, мг | от 48,61 до 53,75 | 50,45 | 49,85 | 49,61 |

Разработанная спецификация качества опытных образцов «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы» включена в проект АНД на лекарственную форму.

Основными параметрами качества капсул является: внешний вид, распадаемость, потеря массы при высушивании, отклонение от средней массы в (%), растворение, количественное содержание действующего вещества.

Контроль основных показателей качества проводили сразу после производства капсул, затем через каждые 3 месяца в течение первого полугодия и каждые 6 месяцев в течение последующего периода.

Капсулы всех серий по внешнему виду, количественному содержанию действующего вещества, микробиологической чистоте соответствовали проекту аналитического нормативного документа на капсулы оксима пиностробина в течение всего периода хранения. По результатам исследования срок хранения капсул оксима пиностробина составила 2 года, хранение лекарственного средства проводили в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C.

5.3. Разработка технологии опытно- промышленного регламента на получения капсул оксима пиностробина 50 мг

В опытно- промышленный регламент входят следующие разделы:

1. Характеристика конечной продукции производства
2. Химическая схема производства
3. Технологическая схема производства
4. Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования
5. Характеристика сырья, материалов, полуфабрикатов
6. Изложение технологического процесса
7. Материальный баланс
8. Переработка и обезвреживание отходов производства
9. Контроль производства и управление технологическим процессом
10. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария
11. Охрана окружающей среды
12. Перечень производственных инструкций
13. Информационные материалы

Характеристика конечной продукции производства

Наименование продукции

Оксима пиностробин 50 мг, капсулы

Основное назначение продукции

Гепатопротекторное

Краткое описание внешнего вида и характерных свойств продукции

Твердые непрозрачные капсулы, наполненные гранулами от белого до белого с желтоватым оттенком цвета. Средняя масса капсулы 200 мг ± 10 %.

Содержание оксима пиностробина в одной капсуле должно быть от 46,25 до 53,75 мг, считая на среднюю массу содержимого капсулы.

Виды и формы упаковок, условия хранения и срок годности

По 25 капсул в банки из стекломассы с треугольным венчиком типа БДС 30-27,5-ОС по ТУ 64-2-239-92 и крышками натягиваемыми полиэтиленовыми типа 1.2-27,5 по ОСТ 64-2-87-81 или в банки из стекломассы с винтовой горловиной типа БВ-30-28-ОС-I по ОСТ 64-2-71-80 с навинчивающимися пластмассовыми крышками типа 1.1 по ОСТ 64-2-87-81 и прокладками из картона с двусторонним полиэтиленовым покрытием по ТУ 64-2-269-78. Свободное пространство в банке заполняют ватой медицинской гигроскопической по ГОСТ 5556-81. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7623-86 или писчей по ГОСТ 18510-87. Каждую банку вместе с листком-вкладышем на государственном и русском языках помещают в пачку из картона потребительской тары марки А или хром-эрзац по ГОСТ 7933-89 Е.

Допускается текст инструкции по применению наносить на пачку.

По 10 капсул в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной марки ЭП-73 по ГОСТ 25250-88 или аналогичной импортной и фольги алюминиевой печатной лакированной по ТУ 48-21-270-94 или аналогичной импортной.

На этикетке или контурной ячейковой упаковке и пачке указывают название страны-производителя, название фирмы и ее товарный знак, название препарата на латинском, государственном и русском языках, международное непатентованное название, лекарственную форму, дозировку, количество капсул в упаковке, условия хранения, регистрационный номер, серию, срок годности, адрес предприятия – изготовителя, предупредительные надписи: «не применять после истечения срока годности», «отпускать по рецепту врача».

На пачке или контурной ячейковой упаковке дополнительно указывают штрих-код.

Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

На этикетке групповой тары дополнительно указывают количество упаковок.

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование в соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

Хранят в защищенном от света месте при температуре не выше + 30 °С.

Срок годности 2 года.

В связи с отсутствием химических превращений химическая схема производства не приводится.

Основные стадии технологической схемы получения капсулированной формы оксима пиностробина на рисунке 5.3.1.

Изложение технологического процесса

Технологический процесс производства капсул оксима пиностробина состоит из 4 технологических стадий, включающих в себя 10 технологических операций.

Технологические стадии процесса производства капсул оксима пиностробина:

ВР 1 Подготовка сырья;

ТП 1 Гранулирование;

ТП 2 Капсулирование и обеспыливание;

УМО 1 Фасовка, маркировка и упаковка капсул.

Технологические стадии процесса производства капсул оксима пиностробина

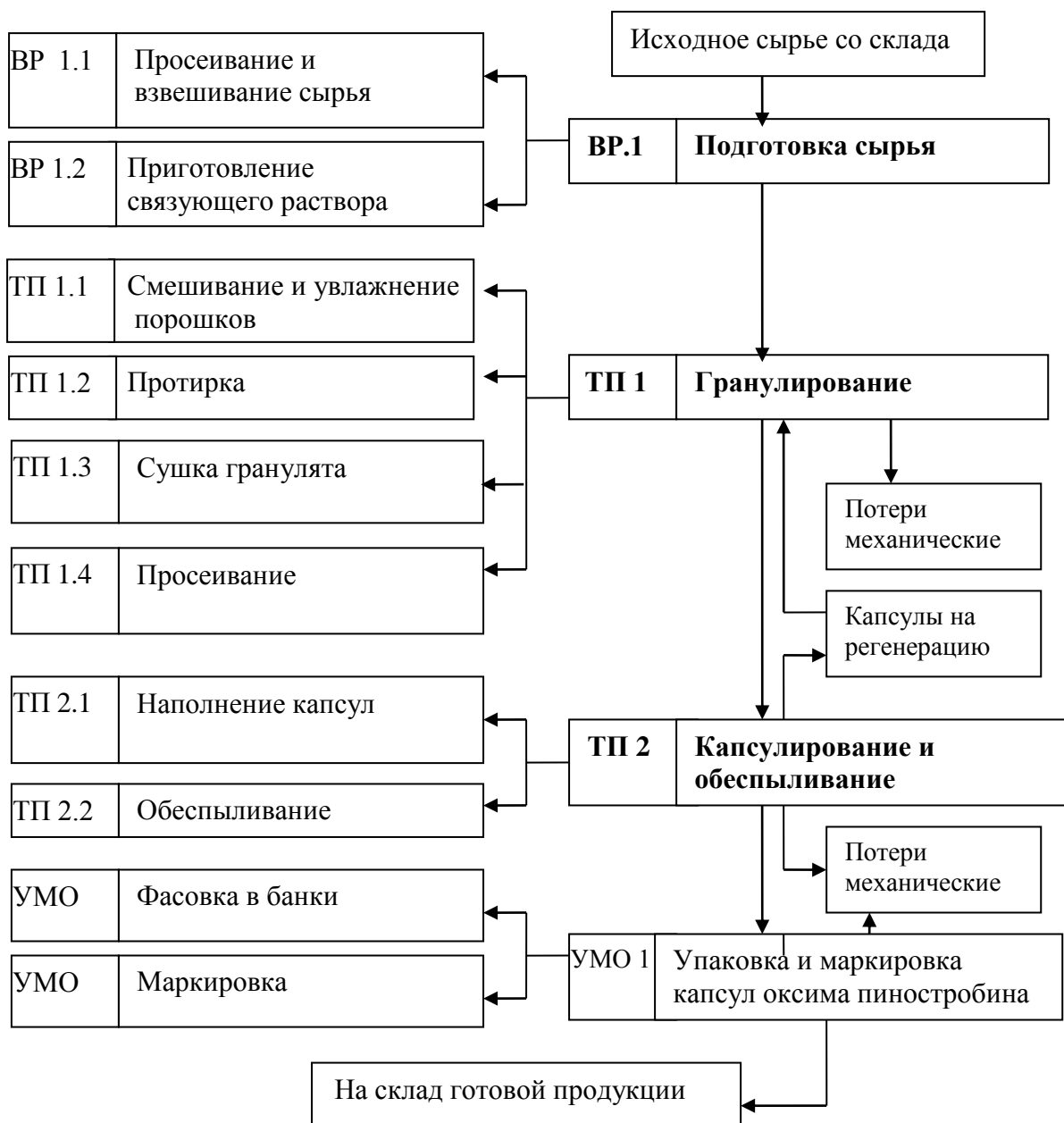


Рис. 5.3.1. Основные стадии технологического процесса производства капсулированной формы оксима пиностробина

АППАРАТУРНАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА И СПЕЦИФИКАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

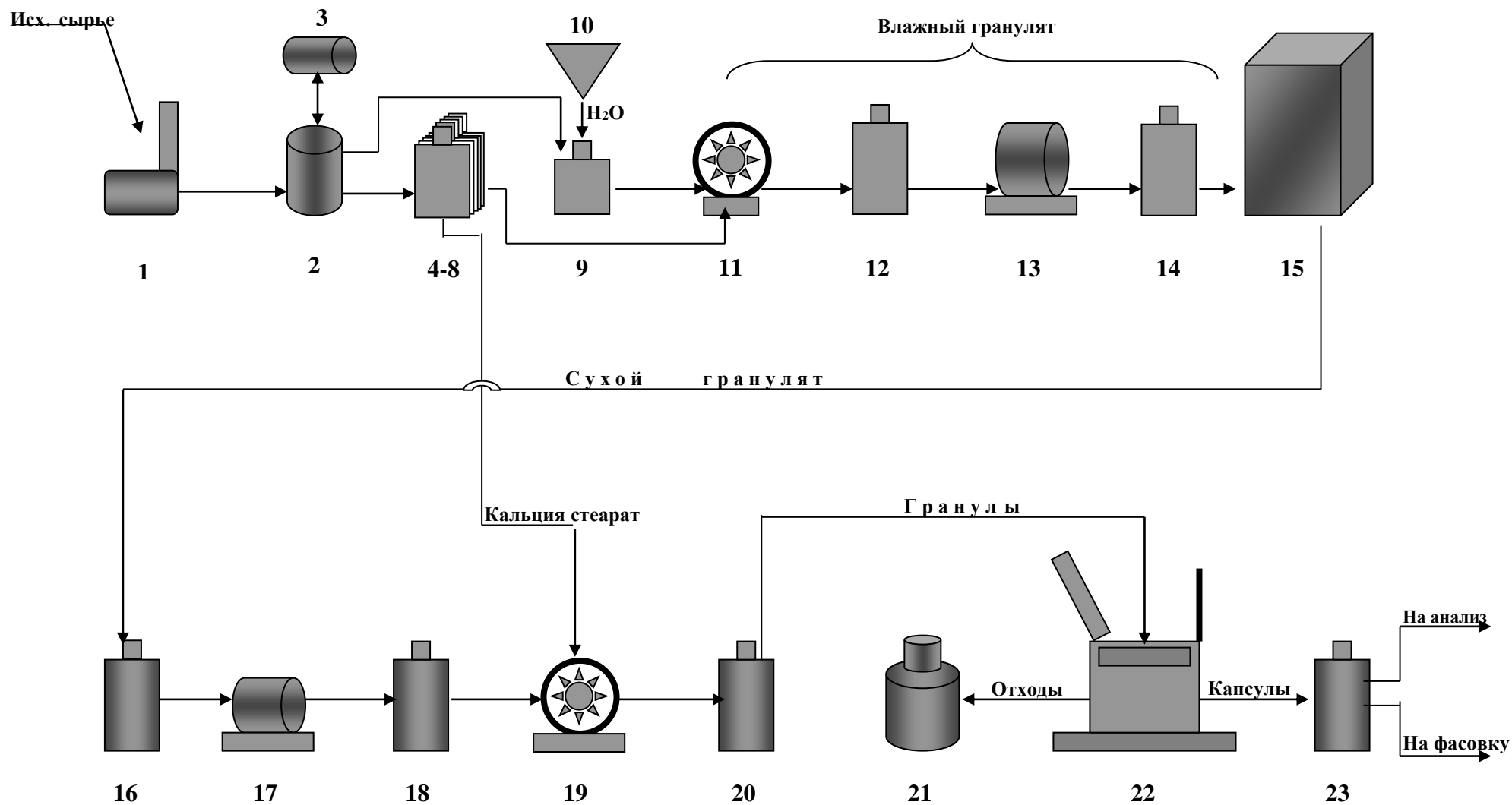


Рис. 5.3.2. Аппаратурная схема производства капсулированной формы оксима пиностробина

Описание технологии капсул оксима пиностробина

ВР 1 Подготовка сырья

Исходное сырье: оксим пиностробин и вспомогательные вещества проверить на соответствие требованиям нормативно-технической документации ВР 1.1.

ВР 1.1 Просеивание и взвешивание сырья

Перед началом смены получить сырье и упаковочные материалы со склада, доставить сырье к тамбур-шлюзу модуля, а упаковочные материалы – в соответствующее отделение упаковки и передать их оператору под роспись в накладной. В развесочной модуля отвесить сырье.

Просеянное сырье не должно содержать посторонних включений (К_т ВР 1.1). Отсевы с сит собирают в сборник отходов 21 и уничтожают сжиганием по мере накопления.

Выход компонентов на технологической операции просеивания и взвешивания составляет 99,5 % на загруженный продукт.

ВР 1.2 Приготовление раствора

ТП 1 Гранулирование

Перед началом работы проверить чистоту и сухость оборудования: смесителя, гранулятора, контейнеров-сборников, лотков и камер сушильного шкафа и другого оборудования, а также исправность электропроводки, приточно-вытяжной вентиляции, средств перевозки сырья и полупродуктов.

ТП 1.1 Смешивание и увлажнение порошков

Просеянное и отвешенное сырье перемешивали в смесителе бочкообразный марки «HD-20», в который загружали поочередно все компоненты.

Смеситель закрыть и включить в работу на скорости 1 (70 об/мин) на 30 минут.

Выгрузить влажную смесь в тарированный сборник влажного гранулята 12, взвесить, прикрепить межоперационный ярлык и передать на стадию протирки.

ТП 1.2 Протирка

Протереть гранулят через сито с диаметром пор 3 мм в грануляторе 13 для формирования гранул, выгрузить в тарированный сборник влажных гранул 14, взвесить, прикрепить межоперационный ярлык и передать на стадию сушки.

ТП 1.3 Сушка гранулята

Влажные гранулы разложить совком на лотки сушильного шкафа 15 слоем 1,5-2 см.

Запрограммировать шкаф на продувку в течение 1 часа при температуре 21°C и сушку в течение 3 часов при температуре 45°C. Во время сушки через 2 часа после выхода шкафа на режим перемешать и разрыхлить гранулят на лотках.

После сушки выгрузить гранулят в сборник сухих гранул 16, взвесить, прикрепить межоперационный ярлык и передать на стадию просеивания. Из сборника 16 отобрать среднюю пробу для определения потери в массе при высушивании.

ТП 1.4 Просеивание

Просеять высушенный гранулят через сито с диаметром пор 1 мм в грануляторе 17, выгрузить в тарированный сборник гранул 18, взвесить, прикрепить межоперационный ярлык и передать на стадию опудривания.

ТП 1.5 Опудривание гранулята

Рассчитать количество опудривающих веществ с учетом потерь гранулята при смешивании, увлажнении порошков, протирке, сушке и просеивании по формуле:

$$OB_1 = \frac{m_1}{m} OB,$$

где OB_1 – рассчитанное с учетом потерь гранулята количество опудривающих веществ, кг;

OB – исходное количество опудривающих веществ, кг;

m_1 - полученная масса сухих гранул, кг;

m - исходная масса сухих гранул, кг.

Высыпать в сборник 18 с просеянным гранулятом опудривающие вещества: кальция стеарат и аэросил из сборников 7, 8, перемешать совком.

Выгрузить смесь в двухконусный смеситель для опудривания 19. Опудривание вести 15 минут.

Выгрузить опудренные гранулы в тарированный сборник капсулируемой массы 20, взвесить, отобрать пробу на анализ в лабораторию контрольно-аналитических работ и стандартизации фитопрепаратов, прикрепить межоперационный ярлык и передать на стадию капсулирования.

Выход продукта на стадии составляет 97 % от теоретически рассчитанного с учетом потерь на стадии ВР 1 количества готовых к капсулированию гранул.

ТП 2 Капсулирование и обеспыливание

Подготовка машины для наполнения твердых желатиновых капсул к работе. Перед началом работы проверить комплектность машины, чистоту загрузочного бункера и столика машины, а также исправность электропроводки, приточно-вытяжной вентиляции, средств перевозки полупродуктов и продуктов.

ТП 2.1 Наполнение капсул

Оператору загрузить капсулами устройство для ориентации пустых твердых желатиновых капсул на 250 капсул машины для наполнения капсул 22 (марки «JTJ – 100А»). После размещения капсул в ячейках и ориентации капсул крышками вверх оператору зажать струбцинами рабочие емкости капсул и открыть их крышки, подняв верхнюю пластину. Отпустив струбцины, установив машину на вибратор, оператору подать гранулят из загрузочного бункера и заполнить капсулы с помощью шпателя. После заполнения всех капсул верхнюю пластину с крышками поставить на место и закрыть капсулы.

Во время капсулирования оператору следить за работой машины и качеством капсул, каждые 30 минут проверять внешний вид и среднюю массу капсулы.

ТП 2.2 Обеспыливание

Закрытые крышками капсулы обеспылить. Оператору выгрузить готовые капсулы в тарированный сборник капсул 23, взвесить, промаркировать их карточкой продукта и сдать на склад до получения протоколов анализа лаборатории контрольно-аналитических работ и стандартизации фитопрепаратов и разрешения на упаковку.

Некондиционные капсулы и отходы собрать в сборник отходов 21.

От каждой серии оператору передать 60 штук капсул в лабораторию контрольно-аналитических работ и стандартизации препаратов для анализа на соответствие требованиям АНД РК.

При получении протокола анализа лаборатории контрольно-аналитических работ и стандартизации с заключением о соответствии качества капсул требованиям нормативной документации контейнер с капсулами со склада промаркировать карточкой с указанием серии, номера протокола анализа и надписью «одобрено» и передать на стадию упаковки.

Выход готовых капсул на стадии составляет 97 %.

УМО 1 Фасовка, маркировка и упаковка капсул

УМО 1.1 Фасовка капсул в банки и блистеры

Фасовка капсул в банки

УМО 1.2 Маркировка

Упаковщику на этикетках или контурной ячейковой упаковке и пачках проставить серию и срок годности препарата, этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7623-86 наклеить на банки.

Каждую банку с капсулами арглабина нативного 50 мг № 25 или 3 блистера № 10 вместе с листком-вкладышем на государственном и русском языках поместить в пачку из картона потребительской тары марки А или хром-эрзац по ГОСТ 7933-89 Е.

Таким образом, на основе лабораторного регламента разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство капсул оксима пиностробина 50 мг (Приложение Ж). В условиях опытно-промышленного производства на «Карагандинском фармацевтическом заводе» разработан процесс капсулирования субстанции оксима пиностробина с выпуском готовой лекарственной формы нового препарата.

5.4. Биофармацевтическое исследование капсулированной формы оксима пиностробина. Исследование абсолютной биодоступности капсул оксима пиностробина

Скорость и полнота всасывания лекарственных веществ являются основными показателями для установления терапевтической эффективности препарата.

Изучение фармакокинетики оксима пиностробина в плазме крови крыс проводилось после его введения внутрь в дозах 50,0 и 500 мг/кг.

На рисунке 5.4.1. представлены усредненные фармакокинетические кривые оксима пиностробина, где исследуемое соединение определяется на протяжении 4 часов после однократного перорального введения капсул и субстанции препарата.

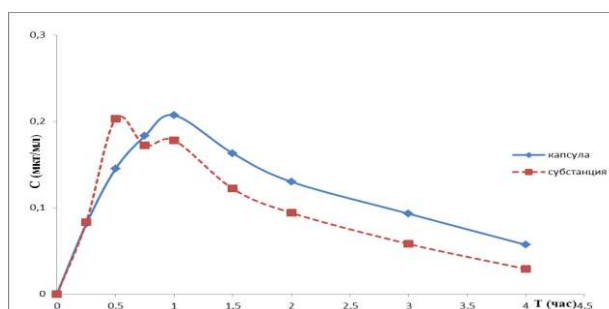


Рис. 5.4.1. Кинетические кривые оксима пиностробина в плазме крови кроликов после его внутрижелудочного введения в виде капсул доза ($36,5 \pm 2,7$ мг/кг) и субстанции (40 мкг/кг)

В таблице 5.4.1. и 5.4.2. представлены индивидуальные концентрации оксима пиностробина в плазме крови животных после введения капсул и субстанции препарата. Из фармакокинетических кривых видно, что для субстанции пиностробина характерно две максимальные концентрации. Первая и основная максимальная концентрация наблюдается через 0,5 часов, а вторая – через 1 час что, возможно, объясняется энтерогепатической рециркуляцией.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (таблица 5.4.3. и 5.4.4.) оксима пиностробина показал, что изучаемое соединение всасывается из желудочного-кишечного тракта (ЖКТ) с разной скоростью (C_{max} / AUC_{0-t} – для капсул этот параметр составил $0,457 \pm 0,050$; для субстанции – $0,564 \pm 0,069$ ч⁻¹).

Таблица 5.4.1 - Концентрация оксима пиностробина (мгк/мл) в плазме крови кроликов после его однократного внутривенного введения в виде капсул в дозе $36,5 \pm 2,7$ мг/кг

| №№ п/п | Время (час) | | | | | | | | |
|-----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,00 | 0,095 | 0,148 | 0,178 | 0,152 | 0,167 | 0,125 | 0,084 | 0,042 |
| 2 | 0,0 | 0,136 | 0,194 | 0,238 | 0,195 | 0,209 | 0,143 | 0,107 | 0,071 |
| 3 | 0,0 | 0,085 | 0,129 | 0,169 | 0,134 | 0,150 | 0,118 | 0,096 | 0,035 |
| 4 | 0,0 | 0,057 | 0,184 | 0,158 | 0,207 | 0,151 | 0,095 | 0,046 | 0,021 |
| 5 | 0,0 | 0,039 | 0,155 | 0,204 | 0,226 | 0,108 | 0,131 | 0,100 | 0,064 |
| 6 | 0,0 | 0,027 | 0,086 | 0,128 | 0,178 | 0,124 | 0,128 | 0,071 | 0,050 |
| 7 | 0,0 | 0,064 | 0,143 | 0,138 | 0,244 | 0,172 | 0,140 | 0,114 | 0,082 |
| 8 | 0,0 | 0,147 | 0,118 | 0,253 | 0,321 | 0,240 | 0,163 | 0,122 | 0,094 |
| x | 0,0 | 0,081 | 0,145 | 0,183 | 0,207 | 0,163 | 0,130 | 0,093 | 0,057 |
| SD | 0,0 | 0,043 | 0,035 | 0,045 | 0,059 | 0,043 | 0,020 | 0,025 | 0,025 |
| S x | 0,0 | 0,015 | 0,012 | 0,016 | 0,021 | 0,015 | 0,007 | 0,009 | 0,009 |
| C.V.% | 0,00 | 53,3 | 24,1 | 24,7 | 28,3 | 26,1 | 15,2 | 26,8 | 43,2 |

Таблица 5.4.2 - Концентрации оксима пиностробина (мкг/мл) в плазме крови кроликов после его однократного внутривенного введения в виде субстанции в дозе 40 мг/кг

| №№ п/п | Время (час) | | | | | | | | |
|-----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,00 | 0,074 | 0,205 | 0,158 | 0,154 | 0,120 | 0,107 | 0,071 | 0,036 |
| 2 | 0,0 | 0,157 | 0,318 | 0,252 | 0,274 | 0,173 | 0,149 | 0,095 | 0,051 |
| 3 | 0,0 | 0,058 | 0,197 | 0,141 | 0,153 | 0,108 | 0,084 | 0,035 | 0,016 |
| 4 | 0,0 | 0,026 | 0,105 | 0,168 | 0,132 | 0,097 | 0,064 | 0,024 | 0,010 |
| 5 | 0,0 | 0,062 | 0,249 | 0,199 | 0,208 | 0,137 | 0,097 | 0,060 | 0,045 |
| 6 | 0,0 | 0,035 | 0,120 | 0,112 | 0,118 | 0,102 | 0,071 | 0,042 | 0,023 |
| 7 | 0,0 | 0,039 | 0,157 | 0,130 | 0,139 | 0,086 | 0,065 | 0,037 | 0,014 |
| 8 | 0,0 | 0,210 | 0,314 | 0,218 | 0,243 | 0,149 | 0,117 | 0,100 | 0,040 |
| x | 0,0 | 0,083 | 0,203 | 0,172 | 0,178 | 0,122 | 0,094 | 0,058 | 0,029 |
| SD | 0,0 | 0,066 | 0,081 | 0,047 | 0,057 | 0,029 | 0,030 | 0,029 | 0,016 |
| S x | 0,0 | 0,023 | 0,029 | 0,017 | 0,020 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,006 |
| C.V.% | 0,00 | 79,5 | 39,0 | 27,6 | 32,1 | 24,2 | 31,3 | 49,1 | 53,0 |

То есть, оксим пиностробин из капсул медленно всасывается по сравнению с субстанцией, и соответственно, время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем для капсул – $0,91 \pm 0,13$ час, а для субстанции – $0,53 \pm 0,09$ час. Таким образом, оксим пиностробин практически в 2 раза медленнее всасывается из ЖКТ в случае его введения в виде капсул по сравнению с субстанцией препарата.

Средняя максимальная концентрация оксима пиностробина, определяется в плазме крови кроликов (C_{max}) составила как для капсул, так и для субстанции – 0,22 мкг/мл. Индивидуальный анализ основного параметра, характеризующего степень биодоступности действующего вещества из лекарственной формы $AUC_{0 \rightarrow t}$ указывает на значительную вариабельность данного параметра. Среднее значение $AUC_{0 \rightarrow t}$ для капсул составило $0,482 \pm 0,098$ и для субстанции – $0,387 \pm 0,136$ мкг/мл \times ч.

Таблица 5.4.3 - Фармакокинетические параметры оксима пиностробина у кроликов после его однократного введения в виде капсул

| №№ | Фармакокинетические параметры | | | | | |
|-------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|--|------------|------------------------|
| | AUC _{0→t} мкг/мл×ч | t _{max} час | C _{max} мкг/мл | C _{max} / AUC _{0→t} ч ⁻¹ | MRT час | f _{отн.} % |
| 1 | 0,444 | 0,750 | 0,176 | 0,39628 | 1,764 | 121,2 |
| 2 | 0,570 | 0,750 | 0,238 | 0,41791 | 1,761 | 96,5 |
| 3 | 0,423 | 0,750 | 0,169 | 0,39941 | 1,821 | 152,1 |
| 4 | 0,381 | 1,000 | 0,207 | 0,54366 | 1,554 | 158,3 |
| 5 | 0,469 | 1,000 | 0,226 | 0,48226 | 1,855 | 129,0 |
| 6 | 0,381 | 1,000 | 0,178 | 0,46704 | 1,892 | 141,6 |
| 7 | 0,524 | 1,000 | 0,244 | 0,46576 | 1,912 | 240,3 |
| 8 | 0,661 | 1,000 | 0,321 | 0,48544 | 1,803 | 132,5 |
| x | 0,482 | 0,91 | 0,22 | 0,457 | 1,80 | 146,4 |
| SD | 0,098 | 0,13 | 0,05 | 0,050 | 0,11 | 42,5 |
| S x | 0,035 | 0,05 | 0,02 | 0,018 | 0,04 | 15,0 |
| C.V.% | 20,3 | 14,3 | 22,8 | 11,0 | 6,2 | 29,0 |

Таблица 5.4.4 - Фармакокинетические параметры оксима пиностробина у кроликов после его однократного введения в виде субстанции

| №№ | Фармакокинетические параметры | | | | |
|-------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|--|------------|
| | AUC _{0→t} мкг/мл×ч | t _{max} час | C _{max} мкг/мл | C _{max} / AUC _{0→t} ч ⁻¹ | MRT час |
| 1 | 0,396 | 0,500 | 0,205 | 0,51719 | 1,694 |
| 2 | 0,603 | 0,500 | 0,318 | 0,52704 | 1,604 |
| 3 | 0,317 | 0,500 | 0,197 | 0,62243 | 1,501 |
| 4 | 0,250 | 0,750 | 0,168 | 0,67234 | 1,490 |
| 5 | 0,429 | 0,500 | 0,249 | 0,57991 | 1,596 |
| 6 | 0,269 | 0,500 | 0,120 | 0,44630 | 1,676 |
| 7 | 0,270 | 0,500 | 0,157 | 0,58256 | 1,539 |
| 8 | 0,559 | 0,500 | 0,314 | 0,56172 | 1,565 |
| x | 0,387 | 0,53 | 0,22 | 0,564 | 1,58 |
| SD | 0,136 | 0,09 | 0,07 | 0,069 | 0,07 |
| S x | 0,048 | 0,03 | 0,03 | 0,024 | 0,03 |
| C.V.% | 35,2 | 16,6 | 35,5 | 12,2 | 4,7 |

Относительная биологическая доступность ($f_{\text{отн.}}$) оксима пиностробина, определяемая отношением индивидуальных значений $AUC_{0 \rightarrow t}$ и доз составляет для капсул по отношению к субстанции в среднем $146,4 \pm 42,5\%$.

Заключение по 5 главе

Приведены исследования технологических свойств субстанции и модельных смесей капсул оксима пиностробина. Обоснована технология изготовления гранул для наполнения капсул. Подобран оптимальный состав капсулированной формы с оксимом пиностробина и проведен комплекс физико-химических, технологических и биофармацевтических исследований оксима пиностробина в капсулах.

Проведена биофармацевтическая оценка предлагаемой лекарственной формы. По данным анализа теста «Растворения» оксим пиностробина высвобождается из капсул за 45 минут и составляет 86%, при значении рН 0,1М кислоты хлороводородной. Относительная биологическая доступность ($f_{\text{отн.}}$) оксима пиностробина, определяемая отношением индивидуальных значений $AUC_{0 \rightarrow t}$ и доз составляет для капсул по отношению к субстанции в среднем $146,4 \pm 42,5\%$.

Подготовлена нормативная документация на субстанцию оксима пиностробина и лекарственную форму в виде проектов АНД (Приложение Е). На основе лабораторного регламента разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство капсул оксима пиностробина 50 мг (Приложение Ж). На базе «Карагандинском фармацевтическом заводе» внедрены в производство эффективные, экономичные и экологически безопасные технологии получения субстанций пиностробина и оксима пиностробина и организован выпуск опытно-промышленных партий капсулированной формы «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы», для проведения клинических исследований (Приложение З).

ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные параметры режима экстракции почек тополя бальзамического с использованием CO₂-газа в сверхкритическом состоянии, обеспечивающие количественное извлечение пиностробина.

2. Впервые для выделения и очистки флавоноида пиностробина из CO₂-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. Разработаны и утверждены нормативные документы в виде проектов на субстанцию пиностробина, оксима пиностробина и оксима пиностробина 50 мг, капсулы. 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).

5. На базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организован выпуск субстанции пиностробина, оксима пиностробина, а также опытных партий лекарственного средства «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Установлено что почки тополя бальзамического является перспективным источником для получения биологически активных флавоноидов.

Предложена новая технология выделения 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.

По результатам исследований разработаны проекты АНД РК на субстанцию пиностробина, оксима пиностробина и капсурованной формы «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы». 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).

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 Карагандинском фармацевтическом заводе производство внедрена в производство технология получения субстанции оксима пиностробина, лекарственной формы «Оксима пиностробина 50 мг, капсулы» и оформлен АКТ внедрения от 15.03.2017 г.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Патент РК № 5696 от 21.06.2001 г. С.М. Адекенов, А.Х. Токпаев, Э.А. Кульмагамбетова, Т.С. Сейтеметов, Л.Н. Прибыткова «Гепатопротекторное и антиоксидантное средство «Салсоколлин».
2. Рахимова А.К., Арыстанова Т.А. Изучение гепатопротекторной активности таблеток «Рувимин» // Фармация Казахстана. - 20084 - №98. - С. 36-38.
3. Патент РК № 20298 от 17.11.2008 г. Л.Н. Пучкина, Г.Е. Жусупова, А.У. Тулегенова «Капсулы «Лимонидин», обладающие гепатопротекторным действием».
4. Патент РК №19034 от 15.01.2008. М.П. Ирismetов, Ш.К. Айнабаева, А.Б. Шукирбекова., Т.А. Арыстанова «Композиция в виде капсул «Биаскин», обладающая антиоксидантной и гепатопротекторной активностью».
5. Дроговоз С.М., Щекина Е.Г., Ушакова А. Современные подходы к терапии заболеваний гепатобилиарной системы //Провизор. - 2008. - № 8. - С. 19-22.
6. Буеверов А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2002. - № 4. - С. 21-25.
7. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. - Новосибирск: АРГА, 2008. - 284 с.
8. Марков Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2005. - № 4. - С. 5-9.

9. Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. Лекарственные препараты на основе диквертина. - Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2005. - 228 с.
10. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Чучалин В.С. Экстракт солянки холмовой (лохеин) – эффективная защита печени. - Томск: СТБ, 2000. - 114 с.
11. Хахулина М.А., Нестерова О.В., Маркарян А.А., Решетняк В.Ю. Новый стоматологический растительный препарат местного действия //Химическая технология. – 2009. - № 1. - С. 36-39.Clerco E. Molecular targets for antiviral agents // J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000, V.297, №1, P.1-10.
12. Rusak G., Krajacic M., Plese N. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. // Antiviral. Res, 1997, V.36, №2, P.125-129.
13. Feldman K.S., Sahasrabudhe K., Smith R.S., Scheuchenzuber W.J. Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor-alpha production and tannin structure // Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, V.9, №7, P.985-990.
14. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев, Наукова думка, 1976, 260с.
15. Clerco E. Molecular targets for antiviral agents // J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000, V.297, №1, P.1-10.
16. Bakay M., Mucsi I. Effect of flavonoids and related substances. Antiviral effect of quercetin, dihydroquercetin and dihydrofisetin // Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1968, V.15, №3, P.223-227.
17. Rusak G., Krajacic M., Plese N. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. // Antiviral. Res, 1997, V.36, №2, P.125-129.
18. Пономарев В.Д. Экстрагирование растительного сырья -М.: Медицина, 1976.- С. 15-20.

19. Патент РФ №2228761 опубл. 20.05.2004г. МКИ С₁ А61 К35/78, А61Р25/32 Средство снижающее токсическое действие алкоголя, и способ его получения. Мясников Д.Н., Кашленский А., Нужный В.П.
20. Патент РФ №2177330 опубл. 27.12.2001г. МКИ С₁ А61 К35/78 Способ получения гепатопротекторного средства. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Добряков Ю.И.
21. Патент РФ № 2179031опубл. 10.02.2002г. МКИ С₁ А61 К35/78Способ получения гепатопротекторного средства. Кушнерова Н.Ф. , Спрыгин В.Г.
22. Патент РФ № 2244553опубл. 20.01.2005г. МКИ С₁ А61 К35/78 - А61К31/05 Способ получения гепатопротекторного средства. Федорев С.А., Музарук Т.И., Булгаков В.П., Гибко Л.И.
23. Яковенко А.В. Григорьев П.Я. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение // Российский медицинский журнал . - 2003. – т.11.- № 5 – С. 19-20.
24. ФС 42-2256-84 «Калефлон».
25. Государственная фармакопея СССР: в 2 вып -11-е изд. М.: Медицина, 1989-Вып.2. - С.146,397.
26. Государственный реестр лекарственных средств. М.: Медицина, 2001. - С. 1004.
27. Бабкин В.А., Остроухова Л.А.,Трофимова Н.Н. Биомасса лиственницы:от химического состава до инновационных продуктов - Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011.-236 с.
28. Лейман З. А. Изучение полифенолов коры лиственницы сибирской: дисс. канд. хим. наук: .02.00.10.- Алма-Ата: КазГУ, 1974. - 143 с.
29. Арыстанова Т.А. Создание лекарственных препаратов на основе компонентов корня солодки и их стандартизация.// Дисс. д.фарм.н. Алматы. 207с.

30. Оболенцева Г.В., Литвиненко В.И., Амосов А.С. Фармакологические и терапевтические свойства препаратов солодки. // Хим.-фарм.журнал -1999 №8 - 24-31с.
31. Бандюкова В.А. Динамика накопления рутина в отдельных частях растения софоры японской // Ученые записки Пятигорского фарминститута. Пятигорск, 1959.-Т.4.-С.52-55.
32. Количественное определение флавоноидов в плодах софоры японской./ О.С.Охременко и др.. // Разработка исследования и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр.-Пятигорск, 2006.-Вып.61.- С.269-270.
33. Горбачева Л.А. Целенаправленное фитохимическое изучение плодов софоры японской.// Дисс. канд.ф.н. – Курск 1998. 121с.
34. Арыстанова Т.А. Создание лекарственных препаратов на основе компонентов корня солодки и их стандартизация // Дисс. д.фарм.н. Алматы. - С.20.
35. Фетхуллина, Г.А. Спектрофотометрическое определение флавонолов и изофлавонолов настойки софоры японской / Г.А. Фетхуллина, Т.И. Буленков // Фармация-1984.-№2.-С.42-44.
36. Евразийский патент №011072 от 30.12.2008 г. С.М. Адекенов «Способ получения цитопротекторного средства».
37. Предпатент РК №17519 от 16.05.2006г. С.М. Адекенов «Способ получения цитопротекторного средства».
38. «Салсоколлин» в лечении хронических гепатитов / Н. С. Умбеталина, Р. С. Досмагамбетова, Р. Д. Конакбаева, Л. Г. Тургунова // Фармация Казахстана. – 2004. - Спец. выпуск. - С. 25-26.
39. Использование салсоколлина в клинике / К.Д.Рахимов, С. М. Адекенов, К. Ж. Мусулманбеков, Ж.А. Вицке, А.Х. Токпаев, Э.А. Кульмагамбетова //Здравоохранение Казахстана. – 1995. - № 11. - С. 52-54.

40. Рахимова А.К., Кусаинова Д.Д., Гуляев А.Е. Цитопротекторные свойства лекарственных препаратов / Под редакцией академика НАН РК С.М. Адекенова. – Алматы: NPrin, 2007. – 340 с.
41. Кусаинова Д.Д., Л.И. Дрaб, М.З. Шайдаров, С.М. Адекенов. Терапевтическая эффективность препарата «Салсоколлин» при хронических диффузных заболеваниях печени // Практическая фитотерапия. – Специальный выпуск. – Москва, 2009. – С. 44–48.
42. Жабаева А.Н., Итжанова Х.И. Разработка технологии сублимационной сушки густого экстракта травы солянки холмовой // Труды VI международного Беремжановского съезда по химии и химической технологии. - Караганда 2008. С.402-403.
43. Земцова Г.Н., Бандюкова В.А. Флавоноиды как лекарственные препараты // Фармация. 1982 №3 68-70с.
44. Патент РФ №2205637 опубл.10.06.2003г. МПК⁷ А61К31/357, А61К35/78, А61Р1/00 Гепатопротекторное средство «Карсилин». Жаров О.В., Новиков С.В.
45. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. - М.: Универсум паблишинг, 1997, - 532 с.
46. Лекарственные препараты зарубежных фирм в России. - М.: Астрафармсервис, 1993, с.350.
47. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Флавоноиды почек *Populus deltoids* химия природных соединений- 1990 № 4 с. 548-550.
48. Поляков В.В. Масло тополя - новый природный биологически активный препарат для медицины и сельского хозяйства // Материалы Респуб. Научно-метод. конференции. Петропавловск. 1997. -Т II. - С. 80-81.
49. Григорьев, Д.Н. Анализ рынка биологически активных добавок / // Бизнес и медицина, 2005.-№5.- С.35-38
50. Mukherjee, B. Hypolipidemic activity of *Catharanthus roseus* leaf extract in mice // Fitoterapia.– 1995.– V.LXVI, N.6.– P. 483-487.

51. V. Krecman Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats // *Planta med.* – 1998. – V.64. – P. 138-142.
52. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность – М.: Наука, 1988. – 247 с.
53. Лекарственные средства. Каталог препаратов, разработанных в ГНЦЛС. – Харьков: Основа, 1995. - 265 с.
54. Дыгай А.М. Применение экстракта шлемника байкальского в качестве гемостимулятора при цитостатической болезни // *Методические рекомендации.* - М., 1992.- 8 с.
55. Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.И. Агафонов Принципы создания лекарственных препаратов – стимуляторов кроветворения природного происхождения // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 1995. - Т.59, № 1. - С. 3-7.
56. Muzes G, Deak G, Lang I, et al. Effect of silimarin (Legalon) therapy on the antioxidant defense mechanism and lipid peroxidation in alcoholic liver disease (double blind protocol). *Orv Hetil* 131:863–866; 1990.
57. О.Ю. Катикова, Я.В. Костин, В.С. Тишкин Гепатопротекторное действие препаратов растительного происхождения // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2002. – Т. 65, №1. – С.41-43.
58. Л.И. Самигуллина, Д.Н. Лазарева Новые перспективы применения препаратов расторопши пятнистой // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2004. – Т.67, №4. – С.77-80.
59. А. Тюкавкина, И.А. Руленко, Ю.А. Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки // *Вопросы питания.* – 1996. - № 2. - С. 33-38.
60. И.А. Селиванова, Н.А. Тюкавкина, Ю.А. Колесник Биофлавоноиды как микронутриенты, лекарственные средства и биологически активные добавки к пище // *Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: докл. II междунар. съезда.* – Санкт-Петербург, 1998. - С. 26-34.

61. Жанымханова П.Ж., Мукушева Г.К. Лекарственные препараты на основе природных флавоноидов // Научно-практический журнал «Фармацевтический бюллетень». – Караганда, 2014. №1-2. -С. 5-21.
62. Chaoyang Maa, Liming Hub, Qianyun Fua, Xiaohong Gua, GuanJun Taoa, Hongxin Wanga Separation of four flavonoids from *Rhodiola rosea* by on-line combination of sample preparation and counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. - 2013. – Vol. 1306. – P. 12–19.
63. H. Yin, S. Zhang, L. Long, H. Yin, X. Tian, X. Luo, H. Nan, S. He The separation of flavonoids from *Pongamia pinnata* using combination columns in high-speed counter-current chromatography with a three-phase solvent system //Journal of Chromatography A. - 2013. – Vol. 1315. - P. 80–85.
64. Liu R., Li A., Sun A., Cui J., Kong L. Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. – 2005. – Vol. 1064, № 1. – P. 53-57.
65. Tian G., Zhang U., Zhang T., Yang F., Ito Y. Separation of flavonoids from the seeds of *Vernonia anthelmintica* Willd by high-speed counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. – 2004. - Vol. 1049, № 1-2. – P. 219-222.
66. Delaunay J.-C., Castagnino C., Chèze C., Vercauteren J. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography //Journal of Chromatography A. - 2002. – Vol. 964, Iss. 1–2. - P. 123–128.
67. Jinfang Xu, Jianguang Luo, Lingyi Kong Simultaneous separation of triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by pH-zone-refining counter-current chromatography //J. Sep. Sci. - 2013. – Vol. 36. – P. 3295–3301.
68. Qianqian Xie, Li Yin, Guoliang Zhang, Yun Wei Separation and purification of isorhamnetin 3-sulphate from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by

counter-current chromatography comparing two kinds of solvent systems //J. Sep. Sci. – 2012. – Vol. 35. – P. 159–165.

69. Патент РФ №2205637 опубликован 10.06.2003г. МПК⁷ А61К31/357, А61К35/78, А61Р1/00 Гепатопротекторное средство «Карсиллин». Жаров О.В., Новиков С.В.

70. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. - М.: Универсум паблишинг, 1997, - 532 с.

71. Поляков В.В, Лежнева М.Ю. Почки тополя - сырье, содержащее биологически-активные вещества //ТРазработка теорет. основ и создание ресурсосберегающих экол. чистых технологий, методов и материалов. Алмата.- 1991. С. 71.

72. Заявка на патент РК №980141 // Поляков ВВ Адекенов С.М. Надиров Р.С., Кротова С.А. Масло тополя, обладающее противоопухолевой активностью. Положительное решение КазПатента от 07.07.99.

73. Поляков В.В. Масло тополя - новый природный биологически активный препарат для медицины и сельского хозяйства //Материалы Респуб. Научно-метод. конференции. Петропавловск. 1997. -Т II. - С. 80-81.

74. Григорьев, Д.Н. Анализ рынка биологически активных добавок / //Бизнес и медицина, 2005.-№5.- С.35-38

75. Mukherjee, B. Hypolipidemic activity of *Catharanthus roseus* leaf extract in mice // *Fitoterapia*.– 1995.– V.LXVI, N.6.– P. 483-487.

76. V. Krecman Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats // *Planta med.*– 1998.– V.64.– P. 138-142.

77. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность – М.: Наука, 1988. – 247 с.

78. Лекарственные средства. Каталог препаратов, разработанных в ГНЦЛС. – Харьков: Основа, 1995. - 265 с.

79. Дыгай А.М. Применение экстракта шлемника байкальского в качестве гемостимулятора при цитостатической болезни //Методические рекомендации. - М., 1992.- 8 с.

80. Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.И. Агафонов Принципы создания лекарственных препаратов – стимуляторов кроветворения природного происхождения // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1995. - Т.59, № 1. - С. 3-7.
81. Muzes G, Deak G, Lang I, et al. Effect of silimarin (Legalon) therapy on the antioxidant defense mechanism and lipid peroxidation in alcoholic liver disease (double blind protocol). Orv Hetil 131:863–866; 1990.
82. О.Ю. Катикова, Я.В. Костин, В.С. Тишкин Гепатопротекторное действие препаратов растительного происхождения // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, №1. – С.41-43.
83. Л.И. Самигуллина, Д.Н. Лазарева Новые перспективы применения препаратов расторопши пятнистой // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т.67, №4. – С.77-80.
84. А. Тюкавкина, И.А. Руленко, Ю.А. Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки /Н // Вопросы питания. – 1996. - № 2. - С. 33-38.
85. И.А. Селиванова, Н.А. Тюкавкина, Ю.А. Колесник Биофлавоноиды как микронутриенты, лекарственные средства и биологически активные добавки к пище // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: докл. II междунар. съезда. – Санкт-Петербург, 1998. - С. 26-34.
86. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. - М.: Универсум паблишинг, 1997, - 532 с.
87. Лекарственные препараты зарубежных фирм в России. - М.: Астрафармсервис, 1993, с.350.
88. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность – М.: Наука, 1988. – 247 с.
89. Лекарственные средства. Каталог препаратов, разработанных в ГНЦЛС. – Харьков: Основа, 1995. - 265 с.
90. Кочет Т.О. Фармацевтический журнал. 1971, т.26, №1, с. 72-74.

91. Duarte R.L.Paiva A.M.A.Rev.Portug.farmac.1966 v16 4 p.388-393.
92. Lotti B.Vezzosi O.Boll. chim.farm.1971, v.110, № 5, p.291-296.).
93. Michaud J. Bull. Soc.pharm.Bordeaux, 1965, v.104, №1, p.25-32.
94. Guernet M., Espinasson E., Hamon . Ann. pharm. franc., 1973, v.31, № 5, p.343-348
95. Chaoyang Maa, Liming Hub, Qianyun Fua, Xiaohong Gua, Guanjun Taoa, Hongxin Wanga Separation of four flavonoids from *Rhodiola rosea* by on-line combination of sample preparation and counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. - 2013. – Vol. 1306. – P. 12–19.
96. H. Yin, S. Zhang, L. Long, H. Yin, X. Tian, X. Luo, H. Nan, S. He The separation of flavonoids from *Pongamia pinnata* using combination columns in high-speed counter-current chromatography with a three-phase solvent system //Journal of Chromatography A. - 2013. – Vol. 1315. - P. 80–85.
97. Liu R., Li A., Sun A., Cui J., Kong L. Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. – 2005. – Vol. 1064, № 1. – P. 53-57.
98. Tian G., Zhang U., Zhang T., Yang F., Ito Y. Separation of flavonoids from the seeds of *Vernonia anthelmintica* Willd by high-speed counter-current chromatography //Journal of Chromatography A. – 2004. - Vol. 1049, № 1-2. – P. 219-222.
99. Delaunay J.-C., Castagnino C., Chèze C., Vercauteren J. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography //Journal of Chromatography A. - 2002. – Vol. 964, Iss. 1–2. - P. 123–128.
100. Jinfang Xu, Jianguang Luo, Lingyi Kong Simultaneous separation of triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by pH-zone-refining counter-current chromatography //J. Sep. Sci. - 2013. – Vol. 36. – P. 3295–3301.

101. Qianqian Xie, Li Yin, Guoliang Zhang, Yun Wei Separation and purification of isorhamnetin 3-sulphate from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by counter-current chromatography comparing two kinds of solvent systems //J. Sep. Sci. – 2012. – Vol. 35. – P. 159–165.

102. Поляков В.В, Лежнева М.Ю. Почки тополя - сырье, содержащее биологически-активные вещества // Разработка теорет. основ и создание ресурсосберегающих экол. чистых технологий, методов и материалов. Алма-ата.- 1991. С. 71.

103. Куркин В.А. , Браславский В.Б. , Запесочная Г.Г. Флавоноиды почек *Populus deltoids* химия природных соединений- 1990 № 4 с. 548-550.

104. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Флавоноиды почек *Populus Balzamifera* химия природных соединений- 1990 № 2 с. 272-273.

105. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Исследование химического состава почек *Populus Balzamifera* методом ВЭЖХ // растительные ресурсы- 1993 –т 29 №3.- С. 85 -90.

106. Поляков В.В., Орлов В.К., Шукенова Р.Ж., Муллаева Н.И. Карбоновые кислоты *Populus Balzamifera* //Химия природ.соед. 1985. №6. С. 894.

107. Донбаева Э.К., Хабаров И.А. Новые производные на основе оксима пиностробина // IV Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ .-Сыктывкар, 2006- С.68.

108. Альжанов С.С, Кульясов А.Т. Гепатопротекторная активность пиностробина и его оксимпроизводного // Материалы 6-го международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» - Санкт- Петербург – 2002- С.351-352.

109. Жанымханова П.Ж. Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.), произрастающего на территории Казахстана и его стандартизация // Научный медицинский журнал «Вестник» Кыргызской

государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. - Бишкек. 2015г. №2. -С. 159-162.

110. 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 // Начно-практический журнал «Фармацевтический бюллетень» 2012г. №4-6. С. 60-63.

111. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-т органической химии. - Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. - 232 с. - ISBN 978-5-9747-0119-1 (в пер.).

112. Кульмагамбетова Э.А. Флавоноиды *Artemisia*, *Populus*, *Salsola*, их химическая модификация и биологическая активность. Дисс ... канд. хим. наук. – Караганда, 2001. – 157 с.

113. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Браславский В.Б. Флавоноиды почек *Populus balsamifera* L. // Химия природ. соедин. - 1990. - №2. - С. 272-273.

114. Государственную фармакопею Республики Казахстан, Т. III., 2014, С. 123-126.

115. Мукушева Г.К., Шульц Э.Э., Жанымханова П.Ж., Дуйсенбаев Н.К., Адекенов С.М. Новые модифицированные производные на основе флавоноида пиностробина // Сборник научных трудов «Химия, структура и функция биомолекул». – Минск. – 2014. – С. 135.

116. Мукушева Г.К., Жанымханова П.Ж., Липеева А.В., Шульц Э.Э., Гатилов Ю.В., Шакиров М.М, Адекенов С.М. Флаванон пиностробин в синтезе кумаринохалконовых гибридов с триазольным линкером // Журнал «Химия гетероциклических соединений», Латвия, г.Рига, 2015. 52(2), С.146-152.

117. Мукушева Г.К., Жанымханова П.Ж., Турысбаева А.Ш., Покровский М.А., Шульц Э.Э., Адекенов С.М. Синтез и цитотоксическая

активность производных гидразона пиностробина // Журнал «Химия природных соединений» 2015. №3. С. 404-410.

118. Мукушева Г.К., Жанымханова П.Ж., Турысбаева А.Ш., Богоявленский А.П., Адекенов С.М. Изучение противовирусной активности некоторых производных гидразона пиностробина // Фармация и фармакология. №6 (7), Пятигорск, 2014. – С.92-95.

119. Евразийский патент №022691 от 29.02.2016. С.М.Адекенов. способ получения гепатопротекторного средства на основе пиностробина из почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.).

120. Мукушева Г.К., Жанымханова П.Ж., Арыстан Л.И., Ли Е.А., Сариев А.К., Адекенов С.М. Фармакологические свойства оксима пиностробина // Сборник научных трудов «Фармакология экстремальных состояний». - Санкт-Петербург, 2015. Т-13. - С.112-113.

121. Жанымханова П.Ж., А.А.Куанбаев, О.Ж. Исина, А.С.Адекенова, В.В.Поляков, Б.Б.Рахимова. Разработка технологии получения оксима пиностробина // Материалы II-ой Международной Казахстанско-Российской конференции по химии и химической технологии -Караганда. -2012.-Т.2.- С.337-338.

122. Жанымханова П.Ж. Технология получения субстанции оксима пиностробина и его стандартизация // Научный медицинский журнал «Вестник» Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. - Бишкек. 2015г. №2. -С. 163-168.

123. Тихонова Е.В., Жанымханова П.Ж., 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: сборник трудов.- Том 1.- Санкт-Петербург, 2010. – С. 229-231.

124. Тихонова Е.В., Жанымханова П.Ж., 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.

125. Тихонова Е.В., Жанымханова П.Ж., Адекенова А.С., Поляков В.В., Адекенов С.М. Оценка критериев качества капсул пиностробина оксима липосомального // «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» Выпуск 66. -Пятигорск, 2011. -С. 325-326.

126. Itzhanova K.H., Zhanymkhanova P.Zh., Mukusheva G.K., Adekenov S.M. The transdermal medical system with pinostrobin oxime // International scientific and practical conference «Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry» Karaganda. - 2015. –P. – 197.

127. 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 // International scientific and practical conference «Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry» Karaganda. -2015. –P. – 201.

128. Toregozhina Z.R., Orazbayeva P.Z., Adekenova A.S., Zhanymkhanova P.Zh., Tuleuova G.H., Adekenov S.M. Standartization oxime of pinostrobin // International scientific and practical conference «Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry» Karaganda. -2015. –P. – 186.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Опытно-промышленный регламент на получение субстанции пиностробина

Для служебного пользования. Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор
ТОО «Карагандинский
фармацевтический завод»

Е.Г. Толоконников
Е.Г. Толоконников
«06» *ноября* 2014 г.

ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ на выделение пиностробина методом центробежной хроматографии распределения

ОПР-40653870-01-14
(обозначение регламента)

Срок действия регламента до «06» *ноября* 2019 г.



СОГЛАСОВАНО
Председатель правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
академик НАН РК, д.х.н., профессор
Е.М. Адекенов
Е.М. Адекенов
«06» *ноября* 2014 г.

Караганда – 2014

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Государственная фармакопея Республики Казахстан

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН**

ТОМ III

ПЕРВОЕ ИЗДАНИЕ

**УТВЕРЖДЕНА
приказом Министра здравоохранения
Республики Казахстан**

**АСТАНА
2014**

| | |
|--|-----|
| 2.7.10. Количественное определение активности фактора свертывания крови VII человека..... | 51 |
| 2.7.11. Количественное определение активности фактора свертывания крови IX человека..... | 53 |
| 2.7.19. Количественное определение активности фактора свертывания крови X человека..... | 54 |
| 2.8. Методы фармакогнозии | |
| 2.8.20. Лекарственное растительное сырье: отбор проб и подготовка образцов..... | 55 |
| 2.8.23. Микроскопическое исследование лекарственного растительного сырья..... | 58 |
| 2.9. Фармако-технологические испытания | |
| 2.9.4. Испытание <i>Растворение</i> для пластырей трансдермальных..... | 59 |
| 2.9.10. Содержание этанола..... | 63 |
| 2.9.11. Испытание на содержание метанола и 2-пропанола..... | 66 |
| 2.9.22. Определение времени полной деформации липофильных суппозиторий..... | 68 |
| 2.9.25. Испытание <i>Растворение</i> для резинок жевательных лекарственных..... | 70 |
| 2.9.27. Однородность массы доз, отмеренных из многодозового контейнера..... | 75 |
| 2.9.34. Насыпная плотность и плотность после уплотнения..... | 75 |
| 2.9.35. Измельченность порошков..... | 79 |
| 2.9.37. Оптическая микроскопия..... | 80 |
| 2.9.38. Оценка распределения частиц по размеру методом аналитического просеивания..... | 83 |
| 2.9.41. Истираемость гранул и сфероидов..... | 88 |
| 2.9.42. Испытание <i>Растворение</i> для липофильных твердых дозированных лекарственных форм..... | 90 |
| 2.9.44. Лекарственные препараты для распыления: оценка..... | 93 |
| 5. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ | |
| 5.2. Общие тексты по биологическим препаратам..... | 101 |
| 5.2.1. Термины, используемые в монографиях на биологические препараты..... | 101 |
| 5.7. Таблица физических характеристик радионуклидов, упоминаемых в фармакопее..... | 102 |
| 5.10. Контроль примесей в субстанциях для фармацевтического применения..... | 108 |
| 5.11. Раздел <i>Описание</i> в монографиях..... | 114 |
| 5.12. Стандартные образцы..... | 115 |
| <11>. Стандартные образцы Фармакопеи США..... | 122 |
| 5.15. Функциональные характеристики вспомогательных веществ..... | 126 |
| 5.16. Кристалличность..... | 130 |
| 5.17.1. Рекомендации по выполнению испытания <i>Растворение</i> дозированных лекарственных форм..... | 133 |

принимаются стандартные образцы фармакопей, с требованиями которых гармонизирована ГФ РК (Европейская фармакопея, Фармакопея США, Британская фармакопея).

Применение стандартных образцов перечисленных выше фармакопей должно осуществляться в соответствии с указаниями, приведенными в гармонизированном тексте монографии или методики. Испытания в соответствии с монографиями Европейской фармакопеи должны проводиться с использованием стандартных образцов Европейской фармакопеи (EP CRS, EP BRP), испытания в соответствии с монографиями и в отдельных случаях по методикам Фармакопеи США – с применением стандартных образцов Фармакопеи США (USP RS), испытания по методикам Британской фармакопеи – с использованием стандартных образцов Британской фармакопеи (BP CRS).

К стандартным образцам ГФ РК относятся также национальные первичные стандартные образцы, предназначенные для испытаний лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Их производство осуществляется из растительного сырья в соответствии с установленными требованиями. Аттестация национальных стандартных образцов ГФ РК проводится РГП «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Перечень национальных стандартных образцов ГФ РК включает следующие:

- СО ГФ РК арглабина;
- СО ГФ РК артемизинина;
- СО ГФ РК ахиллина;
- СО ГФ РК гармина;
- СО ГФ РК гроссегмина;
- СО ГФ РК леукомизина;
- СО ГФ РК лимонена;
- СО ГФ РК пиностробина;
- СО ГФ РК пулегона;
- СО ГФ РК стахидрина;
- СО ГФ РК хамазулена;

– СО ГФ РК цинаротипикрина;

– СО ГФ РК экдистерона;

– СО ГФ РК эхинопсина.

Национальные стандартные образцы ГФ РК используют для идентификации и количественного определения компонентов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.


<11> СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ ФАРМАКОПЕИ США^{USP}

Стандартные образцы, предоставляемые Фармакопейной конвенцией США (USP Reference Standards или USP RS), являются всесторонне охарактеризованными образцами лекарственных средств и продуктов питания (лекарственных субстанций, биологических препаратов, вспомогательных веществ, диетических добавок, ингредиентов питания, примесей, продуктов разложения, стандартов для калибровки и верификации функционирования оборудования). Будучи утвержденными в качестве стандартных образцов, предназначенных для сравнительных испытаний и количественного определения (т.е. в качестве составной части монографий) в Фармакопее США (USP) или Национальном формуляре (NF) данные образцы обладают официальным статусом и легально признаются в США. Пригодность для использования в других целях решается пользователем.

Официальные стандартные образцы Фармакопеи США представляют собой первичные стандартные образцы, признаваемые в данном статусе правоохранительными органами и, в случае приемлемости, откалиброванные относительно международных стандартных материалов, например, предоставляемых Всемирной организацией здравоохранения. Стандартные образцы Фармакопеи США ни в коей мере не предназначены для лечения. Стандартные образцы Фармакопеи США предоставляются для целей легальной метрологической поверки и позволяют обеспечить сопоставимость результатов и их прослеживаемость до единиц Международной системы (SI) независимо от того, сертифицирован материал или нет. Стандартные образцы Фармакопеи США являются стандартными материалами, описанными в издании International Vocabulary of Metrology – Basic


ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Аналитический нормативный документ на субстанцию оксима пиностробина

| | |
|---|--|
|  | |
| УТВЕРЖДЕН Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» <i>Семиф</i> Е.Г. Толоконников от «__» _____ 2015 г. М.П. | |
| ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗСР РК «__» _____ 20__ г. М.П. | ПРИКАЗ Комитета контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК от «__» _____ 20__ г. № _____ М.П. |
| АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ | |
| Наименование лекарственной субстанции Oxim pinostrobin Пиностробиннің оксими Оксим пиностробина | |
| Наименование и страна организации-производителя ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Наименование и страна организации – упаковщика ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Область применения – для приготовления лекарственных препаратов | |
| АНД РК 42- | Срок введения установлен с “__” _____ 20__ г. |
| Вводится впервые | Срок действия до “__” _____ 20__ г. |
| <hr/> | |
| ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ | ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА |

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Аналитический нормативный документ на лекарственную форму оксима пиностробина

| | |
|--|--|
|  | |
| УТВЕРЖДЕН Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» <i>Е.Г. Толоконников</i> от «__» _____ 2015 г. М.П. | |
| ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗСР РК «__» _____ 20__ г. М.П. | ПРИКАЗ Комитета контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК от «__» _____ 20__ г. № _____ М.П. |
| АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ | |
| Наименование лекарственной субстанции Oxim pinostrobin 50 mg, capsule Пиностробин оксимінің 50 мг, капсуласы Оксім пиностробина 50 мг, капсулы | |
| Наименование и страна организации-производителя ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Наименование и страна организации – упаковщика ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан. | |
| Область применения – распространяется на опытную партию для клинических исследований | |
| АНД РК 42- | Срок введения установлен с “__” _____ 20__ г. |
| Вводится впервые | Срок действия до “__” _____ 20__ г. |
| ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ | ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА |

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Опытно-промышленный регламент на производство капсул оксима пиностробина 50 мг

Для служебного пользования. Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ТОО «Карагандинский
фармацевтический завод»

 Е.Г. Толоконников

« 07 » октября 2016 г.

ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство капсул оксима пиностробина 50 мг

ОПР-ФД65005037Р-05-16

(обозначение регламента)

Срок действия регламента до « 07 » октября 2021 г.

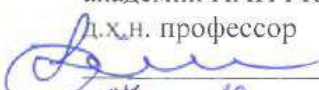
СОГЛАСОВАНО

Председатель правления

АО «МНПХ Фитохимия»

академик НАН РК,

д.х.н. профессор



С. М. Адекенов

2016 г.



Караганда - 2016

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Акт внедрения на производство субстанции оксима пиностробина и готовой формы на его основе



УТВЕРЖДАЮ
Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод»
Е.Г. Толоконников Толоконников Е.Г.
2017 г.

**Акт внедрения
результатов научно-исследовательской работы**

1. Наименование научно-исследовательской работы: Технология производства субстанции оксима пиностробина с выпуском готовой лекарственной формы.

2. Краткая аннотация: Ранее оксим пиностробина согласно утвержденной методики получали взаимодействием пиностробина с солянокислым гидроксиламином в среде этилового спирта в течение 24 часов при температуре 60°C. Данный метод позволял получить оксим пиностробина с сравнительно низким выходом (56%), кроме того при обработке реакционной смеси использовалась соляная кислота, что привело к сильному загрязнению конечного продукта, и затруднениям в последующей очистке, а также его потерям.

3. Эффект от внедрения: Разработана эффективная, экономичная, экологически безопасная технология производства субстанции оксима пиностробина, позволяющая увеличить выход целевого продукта в 1,75 раза (с 56% до 98%) с чистотой не менее 99%, при этом исключена стадия обработки реакционной смеси соляной кислотой и достигнуто повышение производительности труда. В условиях опытно-промышленного производства на Карагандинском фармацевтическом заводе разработан процесс капсулирования субстанции оксима пиностробина с выпуском готовой лекарственной формы нового препарата.

4. Место и время внедрения: ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», 2016-2017 гг.

5. Форма внедрения: Опытно-промышленная технология производства субстанции оксима пиностробина и готовой лекарственной формы на ее основе.

Подписи:

Представители АО «МНПХ «Фитохимия»:
Главный научный сотрудник
член-корреспондент НАН РК,
д.фарм.н., профессор

X. I. Itjanova

(подпись) X. И. Итжанова

Заведующая лабораторией
технологии фитопрепаратов,
к.фарм.н.
Н.с. лаборатории химии
фенольных соединений

A. N. Zhabaeva

(подпись) А. Н. Жабаева

P. Zh. Zhanymkhanova

(подпись) П.Ж. Жанымханова

Представитель
ТОО «Карагандинский
фармацевтический завод»;
Инженер

N. Pirmanova

(подпись) Н. Пирманова