

На правах рукописи



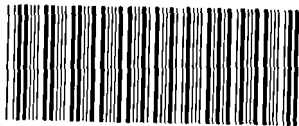
**Крылов Николай Николаевич**

**ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И МЕТОДИК КОНТРОЛЯ  
КАЧЕСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО  
СРЕДСТВА НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

9 АВГ 2017



**006658496**

Пятигорск – 2017

Диссертационная работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** доктор фармацевтических наук, профессор **Компанцева Евгения Владимировна**

**Научный консультант:** доктор фармацевтических наук, доцент **Шевченко Александр Михайлович**

**Официальные оппоненты:** **Бубенчиков Роман Александрович**, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники

**Писарев Дмитрий Иванович**, доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится **«27» сентября 2017 г.** в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.09 при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.pmedpharm.ru>.

Автореферат разослан «27» 09 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Ремезова Ирина Петровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Острые нарушения мозгового кровообращения являются основной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно инсульт развивается у порядка 12 млн. человек, одна третья часть перенесших инсульт людей трудоспособного возраста умирает. С возрастом также увеличивается риск развития инсульта. Две трети инсультов происходят у лиц старше 60 лет.

В постинсультный период для корректировки и нормализации метаболических функций головного мозга, за счет стимуляции мозгового кровообращения, широко применяются ноотропы, они же нейрометаболические стимуляторы, оказывающие позитивное действие при лечении.

Ноотропные препараты пользуются стабильным спросом, рынок их продаж является динамично растущим и не подвержен сезонным колебаниям. Согласно данным литературы, среди ноотропных препаратов преобладают лекарственные средства (ЛС) синтетического происхождения (92,5%), а на долю растительных объектов приходится 7,5%, притом, что большинство потребителей предпочитают последние (Машковский М.Д., 2012). На долю комбинированных ноотропов приходится лишь 1,5% ЛС.

Учитывая побочные действия, которыми сопровождается прием синтетических ноотропов (Машковский М.Д., 2012), важное значение приобретает поиск и разработка способов получения ноотропных препаратов растительного происхождения, сочетающих высокую активность с безопасностью и мягкостью эффекта, что особенно важно в зрелом возрасте.

В последнее время прослеживается перспективное направление создания комбинированных ноотропных средств (лекарственных препаратов (ЛП) и биологически активных добавок (БАД) к пище) на основе оригинальных химических субстанций и биологически активных веществ (БАВ) из

растительного сырья: Винпотропил (РФ), Холитилин (РФ), Омарон (Германия), Фезам (Швейцария), Тиоцетам (Украина), Ноотроп сироп (РФ).

Одним из таких средств является БАД «Гинкготропил», которую выпускает предприятие ООО «Витаукт-пром» (Республика Адыгея). Данная БАД выпускается уже более 5 лет, за этот период она пользовалась стабильным спросом у населения. «Гинкготропил» выпускается в виде таблеток, в состав которых входят измельченные листья гинкго двулопастного, трава лабазника вязолистного и их комплексный экстракт, а также глицин и янтарная кислота. Недостатками данных таблеток является невысокая прочность, большая масса и толщина таблетки из-за большой насыпной массы растительного сырья, вследствие этого неудобство в применении, а также непродолжительный срок годности (1 год). В качестве увлажнителя для измельченных листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного используется ненормированный экстракт этих растений. Для создания ЛП на основе указанной БАД, совершенствования ее технологии и стандартизации Пятигорским медико-фармацевтическим институтом (ПМФИ) с предприятием ООО «Витаукт-пром» заключен договор о творческом сотрудничестве по разработке ЛП растительного происхождения, обладающего ноотропным действием (от 01.06.2014 г. Приложение А).

Так как, при создании ЛП, требования к качеству последнего существенно повышаются по сравнению к таковым у БАД, обоснование и разработка состава, технологии и методик контроля качества нового многокомпонентного ЛП ноотропного действия, содержащего сухие экстракты из листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного и субстанций глицина и янтарной кислоты являются актуальными.

### **Степень разработанности темы**

Патентный и информационный поиск показал, что до настоящего времени в России и за рубежом проведено достаточно много исследований по созданию ЛС – ноотропов растительного происхождения. Заслуживают внимания работы Куркина В.А. и Буланкина Д.Г. (2011 г.), Шиловой И.В. и

Авдеевой Е.Ю. (2008 – 2010 г.) по разработке новых способов получения экстрактов листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного и препаратов на их основе. Однако, сведения о разработке в России комплексных лекарственных препаратов, сочетающих объекты растительного происхождения и синтетические фармацевтические субстанции с различными фармакологическими свойствами, практически отсутствуют, в основном это БАДы. В виду того, что в состав БАД «Гинкготропил» входит глицин, применение которого эффективно только в виде сублингвальных таблеток (Машковский М.Д., 2012), возникает необходимость разработки технологии данной композиции в виде сублингвальной лекарственной формы. Однако, мелкоизмельченное растительное сырье, которое входит в состав БАД «Гинкготропил», будет препятствовать созданию данной лекарственной формы. Таким образом, исследования по замене данных ингредиентов на более технологичные стандартизованные сухие экстракты дадут возможность использовать препарат сублингвально.

Перспективность разработки и стандартизации нового отечественного фитопрепарата с сухими экстрактами из листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, а также глицином и янтарной кислотой обусловлена возможностью его использования в качестве ноотропного, нормализующего процессы обучения и памяти, антиоксидантного средства, используемого в комплексной терапии постинсультного периода.

Все вышеизложенное способствовало определению основной цели и постановке задач для проведения настоящего исследования.

#### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящего исследования явилось обоснование состава, технологии и норм качества сублингвальных таблеток, содержащих сухие экстракты из листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, глицин и янтарную кислоту.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Обосновать состав лекарственных и вспомогательных веществ и технологию сублингвальных таблеток, содержащих сухие экстракты из листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, глицин и янтарную кислоту.
2. Обосновать выбор технологии и методик анализа БАВ сухих экстрактов гинкго двулопастного и лабазника вязолистного, подготовить проекты НД на данные экстракты.
3. Обосновать выбор методик идентификации и количественного определения БАВ экстрактов гинкго двулопастного и лабазника вязолистного, янтарной кислоты и глицина при их совместном присутствии в ЛП. Провести валидационную оценку выбранных методик анализа.
4. Разработать проект ФС и лабораторный регламент на предлагаемый ЛП.
5. Провести сравнительную оценку фармакологического действия и антиоксидантной активности разработанного ЛП.

#### **Научная новизна**

Обоснованы состав и технология оригинального комбинированного растительного ноотропного ЛП, содержащего сухие экстракты из листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, глицин и янтарную кислоту, в форме сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте».

Предложены методики идентификации и количественного определения основных БАВ в листьях гинкго двулопастного и траве лабазника вязолистного, а также в сухих экстрактах листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного и в сублингвальных таблетках, позволяющие их определять при совместном присутствии.

Определены условия качественного и количественного анализа глицина и янтарной кислоты в таблетках при совместном присутствии методом капиллярного электрофореза (КЭ).

Проведена валидация разработанных методик анализа. В условиях долгосрочного исследования стабильности лекарственных средств был определен срок годности сублингвальных таблеток.

По результатам проведенных исследований антиоксидантного и фармакологического действия доказано, что исследуемые таблетки обладают выраженным ноотропным, антиоксидантным и антигипоксическим эффектами, превышающими по эффективности действия препаратов гинкго двулопастного, глицина и янтарной кислоты.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленный в работе теоретический и экспериментальный материал послужил основанием к подтверждению возможности практического использования, предложенного ЛП. Проведенные исследования позволили разработать рациональную технологию производства таблеток комплексного состава, включающих сухие экстракты листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, глицина, кислоты янтарной, разработать методы анализа действующих компонентов, определить для них нормы качества и предложить необходимую НД. По результатам исследования составлены проект ФС и лабораторный регламент производства сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте». Проведена апробация технологии получения таблеток, методов анализа в условиях производства на профильных предприятиях «Вифитех» п. Оболенск, Московской области и «Витаукт-пром», республика Адыгея.

### **Методология и методы исследований.**

В работе использованы физико-химические (ТСХ, спектрофотометрия, капиллярный электрофорез), технологические, биофармацевтические методы исследований. Дизайн исследования в соответствующих алгоритмах учитывает весь диапазон исследований, как технологический, так и аналитический.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- результаты технологических исследований выбора и обоснования комплексного состава сублингвальных таблеток;
- результаты разработки и анализа полученных сухих экстрактов листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, для включения в состав ЛП;

- результаты разработки методик идентификации и количественного определения БАВ в ЛРС, сухих экстрактах листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, а также их валидация;

- результаты разработки методик идентификации и количественного определения основных ингредиентов в таблетках «Гинкготропил-форте» и обоснование их норм качества;

- результаты исследования антиоксидантного, ноотропного и антигипоксического действия сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте».

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Основные положения работы доложены на 69-ой и 70-ой научных конференциях «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (г. Пятигорск, ПМФИ - филиал ВолгГМУ, 2014 г.; 2015 г.), IV-й всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения» (г. Пятигорск, ПМФИ - филиал ВолгГМУ, 2015 г.), 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной 80-летию ВолгГМУ: «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Пятигорск, ПМФИ - филиал ВолгГМУ, 2015 г.), 5 Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием: «Современная фармация: проблемы и перспективы развития» (Владикавказ, СОГМА, 2015 г.), 5-й международной научно-практической телеконференции: «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (г. Белгород, БелГУ, 2015 г.), межрегиональном научно-инновационном конкурсе молодых ученых «У.М.Н.И.К.» (г. Ставрополь, 2014,2015 гг.), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии» (г. Пятигорск, ПМФИ - филиал ВолгГМУ, 2016г.), 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные

проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Пятигорск, ПМФИ - филиал ВолгГМУ, 2016 г.).

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 в журналах из Перечня российских рецензируемых научных журналов, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 145 страницах компьютерного набора и включает в себя 55 таблиц и 22 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», 3 глав экспериментальной части, заключения, списка литературы, приложений. Список литературы включает в себя 139 источников, из них 16 на иностранных языках.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1 Современное состояние исследований в области ноотропных средств растительного происхождения**

Анализ литературных данных показал, что в настоящее время в ассортименте ноотропных ЛП присутствует только 2,5% препаратов растительного происхождения, которые обладают хорошей переносимостью и значительно меньшим количеством побочных эффектов. Основная часть фитопрепаратов ноотропного действия представлена БАДами. В связи с этим являются перспективными исследования по обоснованию состава и стандартизации комбинированного ЛП растительного происхождения.

### **2 Объекты и методы исследования**

Объектами исследования для разработки и стандартизации лекарственного препарата «Гинкготропил-форте» были: 5 партий листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, собранные на участках предприятия ООО «Витаукт-пром» (Республика Адыгея) в 2012 – 2016 гг.; субстанция глицина 99,5 % (WIRUD®GL10001, производитель WIRUD GmbH, Германия) соответствует требованиям Европейской фармакопеи 7 издания,

субстанция янтарной кислоты 99,7 % (Huanlong Food Additives Corporation, Китай) соответствует требованиям фармакопеи США (USP 29).

### **3 Разработка технологии сублингвальных таблеток на основе сухих экстрактов гинкго двулопастного, лабазника вязолистного, глицина и янтарной кислоты**

В рамках договора о творческом сотрудничестве с предприятием «Витаукт-пром», нами за основу при разработке лекарственного препарата (ЛП) был взят состав БАД «Гинкготропил». При создании ЛП на базе БАД «Гинкготропил» возникает вопрос о снижении массы таблетки и повышении срока годности, что может быть достигнуто за счет включения в его состав нормированных сухих экстрактов, дозировка которых на порядок меньше, чем у измельченного ЛРС. Предприятие «Витаукт-пром» имеет завершённый цикл создания БАД «Гинкготропил», т.е. занимается выращиванием как гинкго двулопастного, так и лабазника вязолистного и имеет возможность производить сухие экстракты. Поэтому первым этапом работы была разработка технологии получения сухих экстрактов, вписывающейся в производственный цикл и аппаратное оснащение предприятия «Витаукт-пром».

На первом этапе необходимо было разработать полупродукт для получения сухого экстракта - жидкое спиртовое извлечение. Для получения извлечения был использован метод реперколяции с завершённым циклом при соотношении сырья и экстрагента (спирт этиловый 70%) 1:2. Теоретические расчеты показали, что при заданной степени истощения сырья 95%, установленном коэффициенте поглощения сырья ( $K_n = 2,5$ ) и соотношении сырьё – экстрагент 1:2 число ступеней экстракции для обоих видов сырья будет равно 5.

Сухие экстракты листьев гинкго двулопастного и лабазника вязолистного получали путем выпаривания жидкого экстракта 1:2 под вакуумом при  $t = 40-50$  °С и остаточном давлении 0,15 атм., с последующей сушкой под вакуумом до содержания влаги удовлетворяющее требованиям ГФ XIII (не более 5%).

Проведенные исследования различных серий сухих экстрактов листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного позволили обосновать нормы их качества (таблица 1).

**Таблица 1 – Нормы качества сухих экстрактов листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного**

Показатели	Методы	Нормы качества сухого экстракта листьев гинкго двулопастного	Нормы качества сухого экстракта травы лабазника вязолистного
1	2	3	4
Описание	Визуальный, ГФ XIII ОФС.1.1.0006.15	Аморфный порошок светло-коричневого или коричневого цвета, комкуется, гигроскопичен	Аморфный порошок зеленовато-коричневого цвета со специфическим запахом, вяжущего вкуса, гигроскопичен
Подлинность: Флавоноиды	Качественные реакции: Цианидиновая проба	Розовое окрашивание	Розовое окрашивание
Хлорофилл	ТСХ	Наличие зон адсорбции, соотв. зонам адсорбции стандартизованного сухого экстракта листьев гинкго двулопастного	Наличие зоны адсорбции желто-коричневого цвета соотв. СО рутина, кверцетина
Терпеновые лактоны	ТСХ Качественные реакции: Реакция Либермана-Бурхарда	Красно-фиолетовое окрашивание	Наличие зоны адсорбции красного цвета соотв. хлорофиллу
<b>Числовые показатели</b>			
Количественное определение: Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	Спектрофотометрия	Не менее 10,0%	Не менее 10,0%
Насыпной объем	ГФ XIII ОФС.1.1.0015.15	0,30-0,36 см <sup>3</sup> /г	0,30-0,36 см <sup>3</sup> /г
Потеря массы при высушивании, %	ГФ XIII ОФС.1.5.3.0007.15	Не более 5,0	Не более 5,0
Содержание тяжелых металлов, %	ГФ XIII ФС.1.2.2.2.0012.15	Не более 0,01	Не более 0,01
Растворимость	ГФ XIII ОФС.1.2.1.0005.15	Легко растворим в спирте, растворим в воде	Легко растворим в спирте, растворим в воде

1	2	3	4
Микробиологическая чистота	ГФ XIII ОФС.1.2.4.0012.15	Категория ЗБ	Категория ЗБ
Срок годности	ГФ XIII ОФС.1.1.0009.15	2 года	2 года
Условия хранения	ГФ XIII ОФС.1.1.0011.15	В сухом, защищенном от света месте	В сухом, защищенном от света месте

На основании данных о содержании флавоноидов в БАД «Гинкготропил», литературных сведений и собственных исследований нами предложен состав ЛП «Гинкготропил-форте», представленный в таблице 2.

**Таблица 2 – Состав ЛП «Гинкготропил-форте»**

Экстракт из листьев гинкго двулопастного сухой	0,03
Экстракт из травы лабазника вязолистного сухой	0,03
Глицин	0,10
Янтарная кислота	0,02

Для выбора окончательного состава, было исследовано 6 модельных композиций вспомогательных веществ, обеспечивающих необходимые параметры сублингвальных таблеток. Модельные таблетки оценивались по прочности, распадемости, а также по органолептическим свойствам. Оптимальными характеристиками обладала модельная композиция, состав которой представлен в таблице 3.

**Таблица 3 – Состав препарата «Гинкготропил-форте», таблетки сублингвальные**

Наименование ингредиентов	Количество	
	г/таб.	%
Экстракт гинкго двулопастного сухой	0,030	14,24
Экстракт лабазника вязолистного сухой	0,030	14,24
Глицин	0,100	47,46
Кислота янтарная	0,020	9,49
Вспомогательные компоненты, в том числе:		
Аспасвит Т-200	0,005	2,37
Полипласдон XL 10	0,020	9,49
Кальция стеарат	0,002	0,95
Коллидон 90	0,0037	1,76
Итого масса таблетки	0,2107	100,00

Внешний вид таблеток: таблетки светло-бежевого цвета с белыми вкраплениями с травянистым запахом, кисло-вяжущего вкуса двояковыпуклые, тип 3.2. Диаметр таблеток -  $8,0 \pm 0,05$  мм, высота  $3,1 \pm 0,2$  мм. Таблетки «Гинкготропил-форте» по внешнему виду и геометрическим размерам должны соответствовать требованиям ГФ XIII ОФС.1.4.1.0015.15.

Следующий этап работы посвящен установлению норм качества разработанных сублингвальных таблеток.

#### **4 Разработка методик контроля качества многокомпонентного лекарственного препарата ноотропного действия**

Ввиду отсутствия НД в Российской Федерации для травы лабазника вязолистного следующим этапом исследований было решение задачи по обоснованию норм качества на это растительное сырье. Используя данные ФС фармакопеи республики Беларусь и Европейской фармакопеи 7 издания на траву и цветки лабазника вязолистного, а также результаты собственных исследований позволили нам предложить показатели и нормы качества ЛРС «Лабазника вязолистного трава». Таким образом, для получения сухих экстрактов нами было использовано сырье, отвечающее требованиям ГФ РФ XIII издания ФС.2.5.0010.15 «Гинкго двулопастного листа» и норм качества на «Лабазника вязолистного трава».

В связи с тем, что анализ БАВ сухих экстрактов в разрабатываемых таблетках необходимо проводить при их совместном присутствии нами была проведена сравнительная оценка как методик идентификации, так и количественного определения, которые позволят обнаруживать в смеси как БАВ листьев гинкго двулопастного, так и БАВ травы лабазника вязолистного. За основу идентификации и количественного анализа БАВ было использовано наличие флавоноидов.

Кроме флавоноидов (цианидиновая проба) предлагается подтверждать также наличие терпеновых лактонов по реакции Либермана-Бурхарда – для сухого экстракта листьев гинкго двулопастного.

Идентификацию флавоноидов проводили также методом ТСХ в сравнении со стандартными образцами рутина, кверцетина и стандартизированного экстракта гинкго двулопастного. Детектирование данных веществ проводили в УФ-свете и диазореактивом.

На хроматограмме спиртового извлечения из листьев гинкго двулопастного обнаруживались идентичные зоны адсорбции, как и в стандартизированном экстракте с известными значениями  $R_f$  пятен, которые согласно литературным данным были идентифицированы как: гинкгетин (изогенкгитин); никотифлорин и рутин. На полученных хроматограммах спиртовых извлечений травы лабазника с помощью растворов СО были обнаружены рутин и кверцетин и два неидентифицированных пятна, которые можно отнести также к основной группе БАВ – флавоноидам. Кроме того, при просматривании хроматографической пластинки в УФ-свете при длине волны 365 нм наблюдалось пятно с  $R_f=0,95$ , имеющее красное окрашивание, которое в дальнейшем было идентифицировано как хлорофилл, данное пятно отсутствует в извлечении из листьев гинкго двулопастного.

Исходя из того, что доминирующим флавоноидом травы лабазника является спиреозид, который представляет собой О-гликозид кверцетина и отличается от рутина сахарной частью, нами была изучена возможность использования спектрофотометрической методики, указанной в ФС.2.5.0010.15 «Гинкго двулопастного листа», предусматривающей использование в качестве СО рутин. Полученные спектры поглощения были идентичны, поэтому для количественного определения суммы флавоноидов в траве лабазника вязолистного, а также сухом экстракте была использована адаптированная методика (таблица 1).

Следующим этапом работы был поиск методик контроля качества основных компонентов таблеток «Гинкготропил-форте».

Предложена методика количественного определения суммы глицина и янтарной кислоты методом Сёренсена, использованная в тесте «Растворение для твердых дозированных форм».

Для определения глицина и кислоты янтарной был использован метод капиллярного электрофореза (КЭ), позволяющий определять эти кислоты при совместном присутствии.

Для обоснования выбора pH буферного раствора и оптимальных условий была изучена зависимость константы ионизации данных соединений от pH раствора, с учетом химических свойств и значений pKa по карбоксильной группе глицина (2,31) и янтарной кислоты (pKa<sub>1</sub> = 3,55 и pKa<sub>2</sub> = 5,69), для определения в условиях одного анализа целесообразно использовать ведущий электролит со значением pH ≥ 9 и более, так как оба компонента будут являться анионами и соответственно могут быть проанализированы в условиях КЭ, также было изучено влияние добавки поверхностно-активных компонентов и давления, прикладываемого по ходу анализа (таблица 4).

**Таблица 4 - Выбор оптимальных условий анализа глицина и янтарной кислоты при совместном присутствии**

Условия анализа	Глицин		Янтарная кислота	
	t, мин.	N	t, мин.	N
Боратный буферный раствор pH = 9,0	4,42	10241	12,10	2450
Боратный буферный раствор pH = 10	5,12	2192	18,87	1914
Боратный буферный раствор pH = 9,0 + додецилсульфат натрия 1%	6,18	17681	19,00	20589
Боратный буферный раствор pH = 9,0 + β-циклодекстрин 0,5%	4,95	13312	17,20	1580
Боратный буферный раствор pH = 9,0 + 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин 0,5%	4,92	29212	17,26	4416
<b>Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 10 мБар)</b>	<b>3,5</b>	<b>12040</b>	<b>8,92</b>	<b>14669</b>
Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 20 мБар)	3,1	14390	6,38	9308
Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 30 мБар)	2,53	12012	5,03	6173

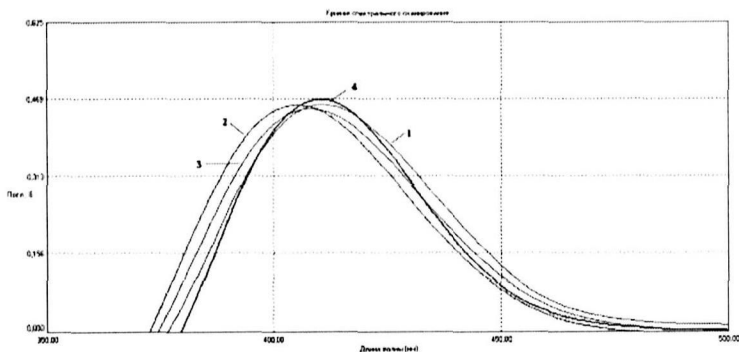
Разработанные условия использовали как для идентификации (по времени миграции), так и количественного определения этих кислот в ЛП «Гинкготропил-форте». Разработанная методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (таблица 5).

**Таблица 5** – Результаты валидации методики определения глицина и янтарной кислоты методом капиллярного электрофореза

Критерий	Нормы	Полученные результаты	
		Глицин	Янтарная кислота
Специфичность	Время миграции пика исследуемого вещества должно соответствовать времени миграции СО	Время миграции 4,5 мин.	Время миграции 8,9 мин.
Линейность	Коэффициент корреляции $ r  \geq 0,99$	$y=259,23x+0,9116$ $ r  \geq 0,99$	$y=1264,3x - 0,0842$ $ r  \geq 0,99$
Аналитическая область	$\pm 20\%$ от заявленного значения содержания	0,0025-0,2000%	0,005-0,04%
Прецизионность, RSD	Не более 3%	1,99%	2,51%
Правильность	Глицин R=95-105% Янтарная кислота R=90-107%	99,9%	96,7%

Для идентификации флавоноидов сухих экстрактов использовали химические реакции и метод ТСХ, о которых было сказано ранее. Для определения количественного содержания суммы флавоноидов сухих экстрактов в таблетках «Гинкготропил-форте» была взята модифицированная нами ранее методика определения в листьях гинкго двулопастного.

Нами был измерен дифференциальный спектр поглощения спиртовых извлечений сухих экстрактов и их смеси. Оказалось, что спектры поглощения совпадают с максимумом поглощения комплекса рутин с алюминия хлоридом (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Спектры поглощения спиртового извлечения из сухого экстракта листьев гинкго двулопастного (1), сухого экстракта травы лабазника вязолистного (2), смесь сухих экстрактов 1:1 (3) и раствора СО рутин с алюминия хлоридом

Используя данные предложенной методики, нами была проанализирована модельная смесь таблеточной массы с точным содержанием сухих экстрактов и была установлена сумма флавоноидов  $7,20 \pm 0,08$  мг в одной таблетке. Это значение соответствует теоретически рассчитанному содержанию суммы флавоноидов.

Данная методика оказалась валидной по показателям, представленным в таблице 6.

**Таблица 6 - Результаты валидации методики определения суммы флавоноидов сухих экстрактов в таблетках «Гинкготропил-форте»**

Критерий	Нормы	Полученные результаты
		Сумма флавоноидов сухих экстрактов
Специфичность	Отсутствие полосы поглощения в области от 400 до 450 нм у вспомогательных веществ таблеток, а также у глицина и янтарной кислоты	Отсутствие полосы поглощения в области от 400 до 450 нм у вспомогательных веществ таблеток, а также у глицина и янтарной кислоты
Линейность	Коэффициент корреляции $ r  \geq 0,99$	$y = 0,1898x + 0,0012$ $ r  \geq 0,9995$
Аналитическая область	$\pm 20\%$ от заявленного значения содержания	От $1,33 \cdot 10^{-5}$ г/мл до $4 \cdot 10^{-5}$ г/мл
Прецизионность, RSD	Не более 3%	$\pm 1,54\%$
Правильность	Если свободный член «а» уравнения регрессии не значительно отличается от нуля, то методика не отягощена системной ошибкой	$y = (0,1898x \pm 0,0105) + (0,0012 \pm 0,0297)$

Кроме методик идентификации и количественного определения флавоноидов для создания нормативной документации проводилось определение однородности дозирования янтарной кислоты и сроков годности в условиях естественного хранения. Таблетки, заложенные на хранение в начале 2014 года после двух лет хранения в естественных условиях, отвечали всем показателям качества, приведенным в таблице 7.

Нормы качества таблеток «Гинкготропил-форте» представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Нормы качества «Гинкготропил-форте», таблетки сублингвальные

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический	Таблетки двояковыпуклой формы светло-бежевого цвета с белыми вкраплениями с травянистым запахом
Подлинность	Качественные реакции:	Красно-фиолетовое окрашивание
- терпеновые лактоны	Либермана-Бурхарда	Розовое окрашивание
- флавоноиды	Качественные реакции: диганидиновая проба	Должны обнаруживаться зоны адсорбции от желто-оранжевого до желто-коричневого цвета с Rf 0,45-0,50 – рутин; Rf 0,50-0,55 – никотифлорин; Rf 0,60-0,62 – кверцетин; Rf 0,80-0,85 – гинкгетин (изогенкитин);
- хлорофилл	ТСХ	Должна обнаруживаться зона адсорбции красного цвета с Rf 0,92 – 0,95 хлорофилл
- глицин	Капиллярный электрофорез	Время миграции должно соответствовать времени миграции пика СО глицина
- кислота янтарная	Капиллярный электрофорез	Время миграции пика должно соответствовать времени миграции пика СО кислоты янтарной
Однородность массы таблеток	ГФ XIII ОФС.1.4.2.0009.15	0,194-0,226 г ( $\pm 7,5\%$ )
Распадаемость	ГФ XIII ОФС.1.4.2.0013.15	Не менее 15 и не более 45 минут
Истираемость таблеток	ГФ XIII ОФС.1.4.2.0004.15	Не более 3% (Прибор 1)
Микробиологическая чистота	ГФ XIII ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 3 Б
Количественное определение:		
Сумма флавоноидов, в пересчете на рутин	Спектрофотометрия	Не менее 6,5 мг
Глицин	Капиллярный электрофорез	90,0 - 110,0 мг
Кислота янтарная	Капиллярный электрофорез	18,5 - 21,5 мг
Однородность дозирования:		
Янтарная кислота	Капиллярный электрофорез	18,5-21,5мг
Улаовка	ГФ XIII ОФС.1.4.1.0001.15	В соответствии с ОФС
Маркировка	ГФ XIII ОФС.1.4.1.0001.15	В соответствии с МУ 9467-015-05749470-98
Хранение	ГФ XIII ОФС.1.1.0011.15	В сухом месте при температуре не выше 25°C
Срок годности	ГФ XIII ОФС.1.1.0009.15	2 года

## 5 Изучение фармакологической и антиоксидантной активности лекарственного препарата «Гинкготропил-форте»

Для подтверждения обоснованности включения в состав препарата сухого экстракта лабазника нами была изучена антиоксидантная активность сухих экстрактов и таблеток методом кулонометрического и амперометрического титрования. Установлено, что антиоксидантная активность сухого экстракта из травы лабазника вязолистного значительно превышает активность сухого экстракта из листьев гинкго двулопастного. Данный факт может служить обоснованием включения данного экстракта в разрабатываемую пропись.

Разрабатываемые таблетки подверглись также изучению фармакологической активности в тестах «Открытое поле» и «гиперкапническая гипоксия».

**Таблица 8 - Результаты изучения ноотропной активности в тесте «Открытое поле»**

Показатель Группа	Двигательная и поисково-исследовательская активность		
	Число пересеченных секторов	Число вертикальных стоек	Число заглядываний
	Δ% к исходному показателю после однократного введения препарата		
Контроль	-8,8	-4,6	-42,9
Янтарная кислота	-0,8	-16,6	78,6
Глицин	-21,9	-25,4	1,9
Гинкго Билоба (капс.)	-20,4	-38,1	92,0
Гинкготропил-форте	-3,8	-37,1	41,1
	Δ% к исходному показателю после 10-тидневного введения препарата		
Контроль	-32,1	-13,8	-65,7
Янтарная кислота	-34,8	-66,2	82,1
Глицин	-63,9	-73,8	-43,4
Гинкго Билоба (капс.)	-48,1	-61,9	42
Гинкготропил-форте	-43,8	-74,2	14,3

В тесте «Открытое поле» экспериментальные животные тратили значительно меньше времени на изучение незнакомой обстановки (таблица 8), что подтверждается снижением количества пересеченных секторов, числа вертикальных стоек, а также увеличение количества заглядываний при применении ЛП «Гинкготропил – форте», что подтверждает наличие ноотропной активности. При этом фармакологический эффект от применения

данной комбинации превосходил таковой у препаратов сравнения: янтарной кислоты, глицина и был сопоставим по величине с эффектом препарата Гинкго Билоба, содержащим сухой экстракт гинкго двулопастного.

**Таблица 9 – Изучение антигипоксической активности исследуемого препарата относительно контроля и препаратов сравнения**

Исследуемый объект \ Время, мин	Время наступления судорог, $m \pm M$ , мин	$\Delta\%$ к контролю	$\Delta\%$ к стандарту
Контроль	15,83 $\pm$ 0,92		
Янтарная кислота	15,66 $\pm$ 0,88 #	-1,1	26,6
Глицин	18,16 $\pm$ 0,92	14,7	9,2
Гинкго Билоба	16,67 $\pm$ 0,96 #	5,3	19,0
Гинкготропил-форте	19,83 $\pm$ 0,64*	25,3	

Примечание: \* - достоверно относительно контроля,  $p \leq 0,05$ ;

# - достоверно относительно препаратов сравнения,  $p \leq 0,05$ .

В тесте «гиперкапническая гипоксия» (таблица 9) применение янтарной кислоты и препарата Гинкго Билоба не оказало значимого влияния на скорость наступления судорог. На фоне введения глицина время наступления судорог было больше на 15%, относительно контроля, при введении же «Гинкготропил – форте» время наступления судорог на 25% выше аналогичного значения у контрольной группы мышей, таким образом «Гинкготропил – форте» оказывает антигипоксическое действие, достоверно превосходящее эффект монотерапии янтарной кислотой и Гинкго Билоба.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные итоги проведенных экспериментальных исследований сводятся к следующим положениям:

- Предложены оптимальные условия проведения качественного и количественного анализа БАВ листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, позволяющие в дальнейшем проводить их определение при совместном присутствии сухих экстрактов этого ЛРС. Для подтверждения подлинности сырья листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного при совместном присутствии необходимо проводить реакции на флавоноиды и терпеновые лактоны (листья гинкго двулопастной), а также ТСХ

методом подтверждать наличие флавоноидов и хлорофилла (трава лабазника вязолистного).

2. Установлено, что определение суммы флавоноидов в траве лабазника вязолистного можно проводить методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на СО рутина. Установлены нормы качества на ЛРС «Лабазника вязолистного трава».

3. Разработана технология получения сухих экстрактов из травы лабазника вязолистного, листьев гинкго двулопастного. Определены показатели качества на предлагаемые сухие экстракты.

4. На основании изучения физико-химических характеристик таблетлируемых масс установлен перечень вспомогательных компонентов, необходимых для создания сублингвальных таблеток. Разработана технологическая схема получения сублингвальных таблеток.

5. Разработана методика количественного определения глицина и янтарной кислоты методом Сёренсена, которая была предложена для использования в тесте «Растворение для твердых дозированных форм».

6. Обоснованы оптимальные условия, разработана и валидирована методика идентификации и количественного определения глицина и янтарной кислоты при совместном присутствии методом КЭ в таблетках «Гинкготропил-форте». Определена однородность дозирования по содержанию янтарной кислоты в таблетках, первый показатель приемлемости (AV) составил 4,92%.

7. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в таблетках «Гинкготропил-форте» методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на СО рутина (RSD  $\pm$ 1,5%).

8. В результате хранения в естественных условиях установлен срок годности препарата, составивший 2 года, и предложены нормы качества таблеток «Гинкготропил-форте», на основе которых составлен проект ФС.

9. Проведенные фармакологические исследования (метод «Открытое поле» и гиперкапническая гипоксия) подтвердили наличие у разрабатываемого ЛП «Гинкготропил-форте» нейротропного и антигипоксического эффекта.

10. С помощью физико-химических методов определена антиоксидантная активность полученных сухих экстрактов из листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного. Для таблеток «Гинкготропил-форте» подтверждено достоверно-значимое увеличение антиоксидантной активности сухого экстракта из травы лабазника вязолистного по сравнению с сухим экстрактом из листьев гинкго двулопастного, позволяющее подтвердить обоснованность включения данного экстракта в предлагаемый лекарственный препарат.

*Перспективы и рекомендации дальнейшей разработки темы* данного диссертационного исследования заключаются в возможности использования полученных результатов с целью разработки технологии и методик анализа новых ЛП комбинированного состава, а также расширения ассортимента отечественных природных ноотропов.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Разработка методики определения глицина и кислоты янтарной в таблетках ноотропного действия методом капиллярного электрофореза [Электронный ресурс] / Н.Н. Крылов, С.П. Сенченко, Е.В. Компанцева, А.М. Шевченко // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/127-20954>.
2. Физико – химические и технологические аспекты разработки сублингвальных таблеток [Электронный ресурс] / Н.Н. Крылов [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 2(2). – Режим доступа: [www.science-education.ru/129-22245](http://www.science-education.ru/129-22245).
3. Крылов, Н.Н. Валидационная оценка методики определения глицина и кислоты янтарной в таблетках ноотропного действия методом капиллярного электрофореза [Электронный ресурс] / Н.Н. Крылов, С.П. Сенченко, Е.В. Компанцева // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 2(2). – Режим доступа: [www.science-education.ru/129-22761](http://www.science-education.ru/129-22761).

4. Крылов, Н.Н. Разработка технологии получения сухого экстракта травы лабазника вязолистного / Н.Н. Крылов, А.М. Шевченко // Науч. ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2016. - №5 (226), вып.33 – С. 141-144.
5. Крылов, Н.Н. Разработка и валидационная оценка методики определения суммы флавоноидов в таблетках ноотропного действия / Н.Н. Крылов, Е.В. Компанцева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №3 (16). – С. 146-151.
6. Крылов, Н.Н. Обоснование состава и методик анализа сублингвальных таблеток на основе экстрактов гинкго, лабазника, глицина и янтарной кислоты / Н.Н. Крылов, Е.В. Компанцева, А.М. Шевченко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 1(10). – С. 84-91.
7. Технологические аспекты разработки сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте» / Н.Н. Крылов, Е.В. Компанцева, А.М. Шевченко, А.В. Корочинский // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сб. материалов 5-й Междунар. науч.-практ. телеконф. 17 апреля 2015 г. – Белгород, 2015. – С. 212-216.
8. Крылов, Н.Н. Определение глицина и кислоты янтарной в многокомпонентном лекарственном средстве / Н.Н. Крылов // Современная фармация: проблемы и перспективы развития: сб. материалов 5 Межрегион. Науч.-практ. конф. с междунар. участием 29-30 мая 2015 г. – Владикавказ, 2015. – С. 73-76.
9. Некоторые аспекты разработки таблеток для применения в полости рта / А.М. Шевченко, Н.Н. Крылов, А.В. Погребняк, А.В. Кузнецов // Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Пятигорск, 2016. – С. 171-180.

**КРЫЛОВ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ**

**ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА  
МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА  
НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата фармацевтических наук

Подписано к печати «10» июля 2017 г. Формат 60×84/16  
Бумага книжно-журнальная. Печать роталитная. Усл. печ. л. 1,0  
Тираж 80 экз. Заказ № 920  
Отпечатано в типографии издательства ООО «РИА-КМВ».  
357500, г. Пятигорск, ул. Февральская, 54  
тел. (8783) 33-36-56, факс (8793) 39-09-03