Карагандинский государственный медицинский университет
АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

УДК 543.544:006+615.07:615.1/.4 На правах рукописи

АДЕКЕНОВА АЙГЕРИМ СЕРИКОВНА

Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств

6D110400 – Фармация

Диссертация на соискание ученой степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
кандидат фармацевтических наук
Г.Х. Тулеуова
доктор фармацевтических наук,
ассоциированный профессор С.А. Ивасенко,
PhD, профессор А. Бертод
PhD, профессор Д. Хохман

Республика Казахстан
Караганда, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

		стр.
НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ…….....		4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ……...		5
ВВЕДЕНИЕ……..		7
1	**ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР** ……..	12
1.1	Стандартные образцы для контроля качества лекарственного сырья, фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм ……..	12
1.2	Технология выделения и очистки биологически активных сесквитерпеновых лактонов……	16
1.3	Технология получения биологически активных алкалоидов из растительного сырья …….....	22
2	**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ** ……...	35
2.1	Материалы исследований ……...	35
2.2	Методы исследований ……	35
3	**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО (*CHARTOLEPIS INTERMEDIA* BOISS.) И ГАРМАЛЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PEGANUM HARMALA* L.)**	39
3.1	Идентификация лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.)……..	39
3.2	Идентификация лекарственного растительного сырья гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.)……	46
4	**ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРОССГЕМИНА, ЦИНАРОПИКРИНА И ГАРМИНА** ……...	52
4.1	Разработка нового способа выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина ……	52
4.2	Разработка технологии получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина ……...	59
4.3	Идентификация и оценка качества стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина ……...	61
4.3.1	Идентификация стандартного образца гроссгемина…….....	61
4.3.2	Спецификация качества стандартного образца гроссгемина……...	64
4.3.3	Идентификация стандартного образца цинаропикрина ……..	71
4.3.4	Оценка качества стандартного образца цинаропикрина ……	73
4.4	Разработка лабораторного регламента получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина …….....	79
4.5	Новый способ выделения и очистки гармина ……...	90
4.6	Разработка технологии получения стандартного образца гармина.	95
4.7	Идентификация и контроль качества стандартного образца гармина ……	96
4.7.1	Идентификация стандартного образца гармина ……...	96
4.7.2	Контроль качества стандартного образца гармина ……..	98

4.8 Разработка лабораторного регламента получения стандартного образца гармина ……... 105
5 ВНЕДРЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРОССГЕМИНА, ЦИНАРОПИКРИНА И ГАРМИНА В КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА ОРИГИНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ……. 114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ……. 116
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ……. 119
ПРИЛОЖЕНИЯ ……. 131

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. № 407-IV ЗРК;
- ГОСО РК 5.04.034-2011: Государственный общеобязательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. № 1080);
- Правила присуждения ученых степеней от 31 марта 2011 года № 127;
- Межгосударственные стандарты: ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;
- ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.
- 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;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2009. – 804 с.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 3. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.
- ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения;
- СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

АО «МНПХ «Фитохимия» - Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

АНД – аналитический нормативный документ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВР – вспомогательные работы

г - грамм

ГФ РК – Государственная Фармакопея Республики Казахстан

ГХ – газовая хроматография

д. - дублет

ИК-спектр - инфракрасный спектр

К - коэффициенту распределения

к. - квартет

$К_т$ – контроль технологический

$К_х$ – контроль химический

кв. - квинтет

кг – килограмм

КК - контроль качества

КССВ - константа спин-спинового взаимодействия

КХ – колоночная хроматография

ЛР – лабораторный регламент

ЛС - лекарственное средство

м. - мультиплет

МГц - мегагерц

м.д. – миллионная доля

мкл – микролитр

мл – миллилитр

$M_г$ – молекулярная масса

нм - нанометр

об - оборот

о.с.ч. – особо чистый

ОФС – общая фармакопейная статья

РСА – рентгеноструктурный анализ

с. - синглет

Система FCPC - Fast Centrifugal Partition Chromatograph (быстрый центробежный хроматограф распределения)

см - сантиметр

СО – стандартный образец

т. - триплет

ТП – технологический процесс

т.пл. - температура плавления

УФ–спектр – ультрафиолетовый спектр
Установка HPLC – установка ВЭЖХ
ФС – фармакопейная статья
ФСО – фармакопейный стандартный образец
х.ч. – химически чистый
ЦХР - центробежная хроматография распределения
ч.д.а. – чистый для анализа
ЯМР - ядерный магнитный резонанс
ЯМР-спектроскопия - спектроскопия ядерного магнитного резонанса
ЯМР ^{13}C - спектроскопия углеродного магнитного резонанса
ЯМР ^{1}H (ПМР-спектр) – спектроскопия протонного магнитного резонанса
COLOC - двумерный спектр ЯМР ^{1}H-^{13}C
COSY– COrrelation SpectroscopY– двумерный спектр ЯМР ^{1}H-^{1}H
CRS - стандартное химическое вещество
CPC - Centrifugal Partitioning Chromatography (центробежная хроматография распределения)
GLP - международный стандарт (надлежащая лабораторная практика)
GMP - международный стандарт (надлежащая производственная практика)
ISO - Международная организация по стандартизации, ИСО
LD_{50} – половинная токсическая доза
μм - микрон

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Работа посвящена разработке стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, которые предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Актуальность проблемы. Стандартные образцы (СО) играют ключевую роль в обеспечении качества на протяжении всего «жизненного цикла» лекарственного средства (ЛС) - начиная от его разработки, в процессе производства и заканчивая контролем качества ЛС на рынке страны. Согласно Европейской фармакопее стандартные образцы используют для достижения надлежащего уровня контроля качества лекарственных средств. Именно стандартные образцы обеспечивают контроль качества на современном уровне: они необходимы для определения подлинности ЛС (т.е. для выявления фальсификата), определения количественного содержания действующего вещества и содержания нежелательных примесей (т.е. для подтверждения эффективности и безопасности ЛС).

Стандартные образцы в фармацевтическом секторе обеспечивают единство измерений, что, в свою очередь, обеспечивает так называемую прослеживаемость результатов анализа, то есть реализацию принципа: результаты анализа, выполненные в различное время в различных местах, должны давать одно и то же заключение о качестве ЛС. Поэтому контроль качества ЛС без использования СО на современном уровне невозможен.

Например, в Британской фармакопее насчитывается около 500 стандартных образцов, в Фармакопее США - около 1300. Если принять во внимание данные Всемирной организации здравоохранения, которые ежегодно публикуются в виде каталога стандартных образцов, выпускаемых как отдельными фармакопеями, так и специально созданными, то всего в мире циркулирует свыше 3700 стандартных образцов лекарственных веществ и их примесей.

По результатам сравнительного анализа наличия стандартных образцов растительного происхождения в Фармакопеях разных стран выявлено, что в «European Pharmacopoeia» (Европейская фармакопея) имеется 75 стандартных образцов; «The United States Pharmacopoeia» (Американская травяная фармакопея) - 36 стандартных образцов; Российской Государственной фармакопее - более 30 стандартных образцов растительного происхождения.

В Казахстанскую Государственную фармакопею стандартные образцы ранее не были включены. Поэтому разработка стандартных образцов для контроля качества отечественных лекарственных средств растительного происхождения является важной и приоритетной задачей.

Цель работы. Разработка стандартных образцов биологически активных соединений гроссгемина, цинаропикрина и гармина, для контроля производства и оценки качества отечественных лекарственных средств растительного происхождения.

Задачи исследования:

- Провести фармакогностическое изучение хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) для идентификации данных видов.
- Разработать новый способ и технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, обеспечивающие стабильную наработку целевых продуктов в необходимом количестве и соответствующего качества.
- Исследовать и обосновать физико-химические показатели и спектральные данные, регламентирующие идентификацию и качество полученных стандартных образцов.
- Разработать проекты нормативных документов на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина, в виде проектов АНД и лабораторных регламентов на получение.
- Внедрить, полученные стандартные образцы, в постадийный контроль производства и оценку качества оригинальных лекарственных средств растительного происхождения.

Объекты исследования: лекарственное сырье: хартолепис средний трава (*Chartolepis intermedia* Boiss.), гармала обыкновенная корни (*Peganum harmala* L.); суммы экстрактивных веществ: густой этилацетатный экстракт хартолеписа среднего, густой спиртовый экстракт гармалы обыкновенной; стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина.

Предмет исследования: биоморфологические особенности, диагностические признаки и товароведческие показатели травы хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), корней гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.), описание и спектральные данные гроссгемина, цинаропикрина и гармина; способ и технология получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина; физико-химические показатели и спектральные стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина; нормативная документация на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина.

Методы исследования: для достижения поставленной цели и решения задач использован комплекс современных физико-химических методов разделения и анализа: центробежная хроматография разделения (ЦХР), препаративная и аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), инфракрасная (ИК) и ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия, рентгеноструктурный и элементный анализ, температура плавления.

Связь работы с планом государственных научных программ. Диссертационная работа выполнена в АО МНПХ «Фитохимия» в рамках проекта «Разработка новых биологически активных соединений и организация Республиканского банка стандартных образцов лекарственных веществ» (№ гос. регистрации 0112РК00406) на 2012-2014 гг., проекта «Новые технологии получения фармакологически активных веществ из растительного сырья» (№

гос. регистрации 0113РК00396) на 2013-2015 гг., программы 0.0676 «Разработка новых фармакологических соединений – субстанций оригинальных лекарственных препаратов и их стандартных образцов» (№ гос. регистрации 0115РК01200) на 2015-2017 гг.

Научная новизна работы:

- проведена идентификация лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) по совокупности основополагающих факторов: внешних и микроскопических характеристик, качественного и количественного содержания биологически активных веществ гроссгемина, цинаропикрина, гармина, результатов товароведческого анализа;
- разработан новый способ выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии; разработан новый способ выделения и очистки алкалоида гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения;
- разработаны эффективные, экономичные и экологически безопасные технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, обеспечивающие количественный выход качественных целевых продуктов;
- описаны физико-химические и спектральные показатели полученных стандартных образцов, которые будут использованы для идентификации и количественного определения гроссгемина, цинаропикрина и гармина в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах;
- разработаны спецификации качества и проведена стандартизация гроссгемина, цинаропикрина и гармина в качестве стандартных образцов; для включения в Государственную фармакопею Казахстана подготовлены досье на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина и представлены в РГП на ПХФ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники».

Практическая значимость работы:

- показатели фармакогностического исследования и результаты товароведческого анализа хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) включены в проекты АНД на лекарственное растительное сырье «Хартолепис средний трава» и «Гармала обыкновенная корни» для идентификации данных видов;
- разработаны, апробированы и внедрены технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, которые обеспечивают стабильную наработку целевых продуктов в необходимом количестве и соответствующего качества;
- разработаны проекты АНД на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина;

- гроссгемин, цинаропикрин и гармин включены в качестве национальных стандартных образцов в Государственную фармакопею Республики Казахстан, которые предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ГФ РК, Т. III., 2014);
- разработаны и утверждены лабораторные регламенты на получение стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина (ЛР 40761819-07-14) и гармина (ЛР 40761819-08-14);
- на базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия» организован выпуск стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина;
- стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина внедрены в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для постадийного контроля производства и оценки качества лекарственных растительных средств: «Хартинол» противовирусного действия, «Саусалин» противопаразитарного действия и «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия, в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

Обоснованность и достоверность. Исследования проведены с применением современного, поверенного оборудования, позволяющего получать достоверные и надежные результаты.

Основные положения, выносимые на защиту:

- биоморфологические особенности, диагностические признаки и результаты товароведческого анализа воздушно-сухого сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.);
- новый способ и технология получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, обеспечивающие количественный выход качественных целевых продуктов;
- физико-химические показатели и спектральные данные, регламентирующие идентификацию и качество полученных стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина;
- нормативные документы на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина, в виде проектов АНД и лабораторных регламентов на получение;
- внедрение, полученных стандартных образцов, в постадийный контроль производства и оценку качества отечественных лекарственных средств растительного происхождения в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

Личный вклад автора заключается в исследованиях, выполненных лично соискателем и включенных в диссертацию: в проведении фармакогностического изучения, в разработке нового способа и технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, в разработке нормативных документов и внедрении стандартных образцов

гроссгемина, цинаропикрина и гармина, интерпретации и обобщении полученных экспериментальных данных.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на: 68-й региональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Волгоград, 22-25 января 2013 г.); 69-й региональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 28-31 января 2014 г.); Всероссийской научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ» (Сыктывкар, 4-6 июня 2014 г.); International research and practice conference «Achievements and prospects for the development of phytochemistry» (Караганда, 10-11 апреля 2015 г.).

Публикации. По материалам диссертации подана 1 заявка на патент РК, основные положения диссертации отражены в следующих публикациях:

- 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан;
- 1 статья в зарубежном научном издании, входящем в базы данных Thomson Reuters и Scopus;
- 1 статья в международном научном издании, входящем в базу данных Scopus;
- тезисы 5 докладов на международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, включает 30 рисунков и 10 таблиц; состоит из введения, 5 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 157 литературных источников.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Стандартные образцы для контроля качества лекарственного сырья, фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм

Стандартные образцы – одно из важнейших звеньев обеспечения контроля качества лекарственных средств [1].

Согласно Европейской фармакопее (ЕФ) «стандартные образцы (СО) используют для достижения надлежащего уровня контроля качества лекарственных средств (ЛС)» [2, 3]. СО применяют для контроля качества ЛС начиная от разработки медицинских препаратов и вплоть до их использования потребителем. При разработке лекарств уже на стадии валидации аналитических методик необходимо уделять серьезное внимание использованию СО [4, 5].

В публикации [6] рассмотрена роль СО в контроле качества лекарственных средств и роль официальных (фармакопейных) СО для обеспечения качества лекарств, а также безопасности последних для потребителя. Проанализированы критические аспекты, обуславливающие доступность фармакопейных стандартных образцов (ФСО) для контроля качества ЛС на рынке страны. Проведена сравнительная характеристика ФСО Государственной фармакопеи Украины, Европейской фармакопеи, Фармакопеи США и Британской фармакопеи [7].

Стандартные образцы являются одним из ключевых элементов системы стандартизации лекарственных средств. В фармакопейном анализе Российской Федерации, а также стран ближнего и дальнего зарубежья применение стандартных образцов регламентируется соответствующими нормативными документами и монографиями фармакопей. Существуют различные квалификации стандартных образцов и, в зависимости от назначения, программы их аттестации [8].

При стандартизации сырья, фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм используются как фармакопейные стандартные образцы, так и универсальные стандартные образцы активных фармацевтических субстанций и их примесей, стандартные образцы растительного происхождения, а также физико-химические стандартные образцы для калибровки измерительной аппаратуры.

А. Фармакопейные стандартные образцы.

Главным правилом является то, что гарантия фармакопеи дается при условии применения стандартных образцов исключительно в соответствии со статьями конкретной фармакопеи. Все отклонения от описания и модификации методов приводят к тому, что пользователь должен самостоятельно доказывать соответствие образцов поставленной цели. Кроме того, необходимо помнить, что:

- стандартные образцы имеют разное предназначение: образцы Европейской Фармакопеи предназначены только для анализа лекарственного сырья, стандартные образцы Американской Фармакопеи - для анализа сырья и лекарственных препаратов. Стандартные образцы Фармакопее Российской

Федерации также используются для анализа лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов;

- **стандартные образцы с одним и тем же названием могут иметь разное предназначение:** для качественного и количественного анализа, проверки эффективности аналитической системы (например, эффективности и разрешения хроматографической колонки) и т.д. Перед тем, как выбрать стандартный образец, обязательно следует выяснить, для какой цели он разработан;

- **стандартные образцы могут представлять собой** не только чистые вещества или их растворы, но и отнесения спектров веществ, например, отнесения ИК-спектров в Европейской фармакопее;

- **как правило, стандартные образцы поставляются без сертификатов** анализа или подобной документации, хотя существует ряд исключений. Главным из них являются стандартные образцы Международной Фармакопеи (ВОЗ), которые всегда сопровождаются сертификатами. Помимо этого, различного рода документы сопровождают стандартные образцы, предназначенные для калибровки аппаратуры, применяемой для контроля высвобождения активных веществ или стандартные образцы для проверки эффективности системы. В 2009 году поступили в продажу первые четыре аттестованных стандартных образца, произведенные по Американской Фармакопее согласно требованиям руководств ISO и имеющие сертификаты анализа;

- **для фармакопейных стандартных образцов не определяется срок годности.** Обусловлено это тем, что фармакопейные стандартные образцы следует использовать в кратчайшие сроки после их покупки. Не рекомендуется длительное хранение образцов после вскрытия упаковки. Тенденция поставки стандартных образцов в упаковках, достаточных для проведения лишь одного анализа, особенно заметна в Европейской Фармакопее. Не рекомендуется одноразовое приобретение большого количества упаковок одного стандартного образца «про запас» - в этом случае возникает риск того, что стандартный образец будет изъят из продажи и аннулирован, вследствие чего созданные запасы окажутся непригодными;

- **возможно изменение величины упаковки стандартного образца** производителем, который оптимизирует количество поставляемой субстанции в соответствии с описанным в фармакопейной статье способом применения образца;

- некоторые стандартные образцы требуют проведения дополнительных анализов (например, определения содержания воды) перед его использованием;

- **факт указания вещества** (например, примеси активной фармацевтической субстанции) в фармакопейной статье одной из фармакопеи не означает, что данная фармакопея автоматически поставляет её стандартный образец. Тем не менее, наличие этого стандартного образца в лаборатории вменяется в обязанность пользователю.

B. Стандартные фитохимические образцы и стандартные образцы растений.

Небольшое количество фитохимических стандартных образцов веществ растительного происхождения предлагается фармакопеями (например, рутин), но, в основном, пользователи вынуждены искать другие источники. Из-за сложной химической структуры этих субстанций, и трудности их получения, это непростая задача. Обычно фитохимические стандартные образцы имеют сертификат (или документ под другим названием), который обеспечивает гарантию качества, но зачастую он не соответствует требованиям ISO.

Выбирая фитохимический стандартный образец, необходимо акцентировать внимание на его предназначение. Часто доступны стандартные образцы одного и того же вещества разного предназначения (для качественного или количественного анализа).

Отдельным сложным вопросом является анализ стандартных образцов растений. При их идентификации часто недостаточно только химического анализа, но также нужны макроскопические и/или микроскопические профили сырья. Так называемые стандартные образцы растительного происхождения (HDRS - herbal drug reference standards), охарактеризованные по совокупности указанных видов анализа. На данном этапе они только появляются и ещё не широко доступны.

C. Универсальные стандартные образцы химических веществ.

Определение «универсальные» было использовано в данном случае для подчеркивания факта, что эти стандартные образцы не связаны ни с одной из фармакопеи. Их производители стремятся к достижению полного соответствия этих продуктов требованиям ISO. Это прекрасная альтернатива стандартным образцам фармакопеи во всех случаях, когда:

■ используется собственные методы анализа или модифицируются методы, описанные в фармакопеях;

■ внутренние процедуры лаборатории или заказчика требуют использования стандартных образцов с сертификатами. Использование этих материалов является единственным выходом в ситуации, когда фармакопеи не предлагают необходимые лабораториям стандартные образцы, особенно стандартные образцы примесей фармацевтических субстанций.

Аналогично предыдущим случаям, очень важно соблюдать рекомендации производителя относительно использования материалов. Необходимо обратить особое внимание на тот факт, что вещества, которые в одном случае являются активными фармацевтическими субстанциями, в другом могут быть примесями основного вещества. В связи с этим, образец с одним и тем же названием может являться образцом для определения содержания основного компонента или примеси. Такие стандартные образцы исследуются разными способами - стандартные образцы примесей подвергаются менее жесткому контролю, и применение их для определения содержания основного вещества может привести к ошибке. Принимая решение о выборе источника «универсальных» стандартных образцов, необходимо проверить достаточно ли хорошо образцы охарактеризованы. Это важно при переходе от одной партии стандартного

образца к другой или при замещении используемого ранее стандартного образца на произведенный другим производителем. Указанные для обоих образцов данные должны позволять производить простой и достоверный пересчет и сравнение результатов, полученных при использовании каждого из них. Это одно из важных требований к стандартным образцам в системе GLP.

D. Стандартные образцы для калибровки аппаратуры

Конечно, описанные в предыдущих пунктах образцы также служат (или могут служить) для калибровки аналитической аппаратуры, предназначенной для анализа фармацевтических веществ. Кроме неё, в каждой лаборатории используются вспомогательные приборы, такие как pH-метры, рефрактометры, поляриметры, спектрометры и многие другие, которые также требуют систематической калибровки. Для этого служат определенные стандартные образцы (стандарты). Некоторые из них предлагаются фармакопеями (например, стандартные образцы температур плавления), во всех остальных случаях необходимо пользоваться стандартными образцами других производителей. В отличие от обсуждаемых ранее групп, в этом случае поиск соответствующих образцов достаточно прост: их производством занимаются как государственные метрологические институты, так и многие коммерческие фирмы. Приступая к выбору требуемого образца, следует учесть соответствие образца и прилагаемой к нему документации (сертификата) требованиям ISO, в том числе, обратить внимание на соблюдение прослеживаемости измерений.

Именно такой подход предполагает Европейская Фармакопея, где помимо понятия стандартного химического вещества (CRS), приводится еще и понятие сертифицированного (аттестованного) стандартного образца согласно определению ISO. Итак, стандартные образцы являются фактором, непосредственно влияющим на качество получаемых лабораторией результатов, позволяющих контролировать качество всех этапов производства лекарственных препаратов по стандартам GMP.

По результатам проведенного сравнительного анализа наличия стандартных образцов растительного происхождения в Фармакопеях разных стран выявлено, что в «European Pharmacopoeia» (Европейская фармакопея) имеется 75 стандартных образцов [9]; «The United States Pharmacopoeia» (Американская травяная фармакопея) - 36 стандартных образцов [10]; Российской Государственной фармакопее - более 30 стандартных образцов растительного происхождения [11]. В Казахстанскую Государственную фармакопею стандартные образцы не включены [12, 13]. Стандартный образец кверцетина содержится в Европейской, Американской и Российской фармакопеях. В настоящее время Фармакопейный центр Украины обеспечивает аттестацию СО для всех направлений, необходимых в фармацевтическом анализе ЛС [14].

Согласно сравнительному анализу, следующие стандартные образцы имеются в Европейской и Американской фармакопеях: хлорогеновая кислота (депсид кофейной и хинной кислот), гинкголид (терпеноид), гидрастин (алкалоид), салицин (глюкозид). Стандартные образцы растительного происхождения приводятся в Российской и Европейской фармакопеях: арбутин

(гликозид), капсаицин (алкалоид), дигитоксин (сердечный гликозид), дигоксин (сердечный гликозид). Стандартный образец растительного происхождения флавоноид рутин имеется в Российской и Американской фармакопеях.

Таким образом, использование стандартных образцов затрагивает все аспекты контроля качества ЛС и является насущной потребностью внедрения в фармакопейный анализ собственных стандартных образцов Республики Казахстан. Поскольку в Казахстанскую Государственную фармакопею стандартные образцы не включены, разработка стандартных образцов для контроля качества отечественных лекарственных средств растительного происхождения является важной и приоритетной задачей [15-17].

1.2 Технология выделения и очистки биологически активных сесквитерпеновых лактонов

Технологии выделения сесквитерпеновых лактонов весьма разнообразны, что обусловлено различием их физических и химических свойств, а также видом растительного материала. Основу технологии выделения сесквитерпеновых лактонов составляет экстракция сырья различными органическими растворителями с последующей хроматографической очисткой [18].

Например, α-сантонин (**1**) – первый сесквитерпеновый лактон, который был применен в медицине в качестве противопаразитарного препарата.

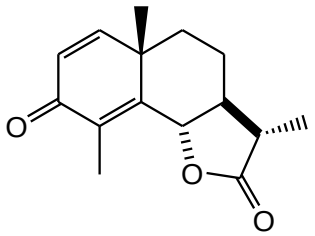
Технологический процесс производства сесквитерпенового лактона α-сантонина (**1**) из сырья полыни цитварной (*Artemisia cina* Berg.) включает в себя 4 стадии [19]:

− первая стадия - сырье (цветочные корзинки полыни цитварной) замачивают в воде и смешивают с известью, при этом α-сантонин образует соль сантониновой кислоты;

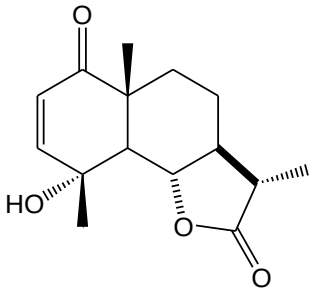
− на второй стадии проводится выщелачивание кальциевой соли сантониновой кислоты водой, содержание α-сантонина в вытяжке составляет от 0,7 до 1,4 %;

− третья стадия - концентрированную вытяжку, содержащую кальцевую соль сантониновой кислоты, смолы и другие экстрактивные вещества, подкисляют азотной кислотой, при этом образуется нитрат кальция и сантониновая кислота, которая медленно превращается в α-сантонин-сырец, который десятикратно промывают водой до нейтральной реакции, затем отжимают на центрифуге и сушат в сушильном шкафу. Выход на этой стадии около 80 %;

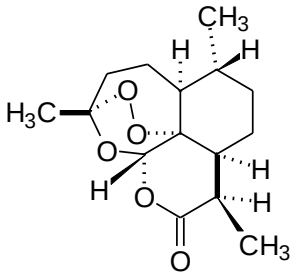
− четвертая стадия - очистка технического α-сантонина многократной кристаллизацией из этилового спирта и последующей очисткой на фильтрующем аппарате. Из кристаллизаторов α-сантонин переносят на центрифугу, где отжимают и промывают дистиллированной водой. Выход чистого α-сантонина на данной стадии составляет 80-84 %. Общий выход α-сантонина зависит от содержания целевого вещества в исходном сырье, а также от количества проведенных перекристаллизаций.



(**1**)



(**2**)



(**3**)

Производство субстанции препарата «Тауремизин» [20] - сесквитерпенового лактона тауремизина (**2**) из полыни таврической (*Artemisia taurica* Willd.) тоже является многостадийным и трудоемким процессом:

- воздушно-сухую надземную часть полыни таврической обрабатывают по принципу противотока горячей водой в течение 30 мин при температуре 75-80 °С;

- водное извлечение три раза обрабатывают хлороформом в соотношении 10:1, 20:1, 20:1; хлороформные извлечения объединяют, хлороформ отгоняют без вакуума до остаточного объема 1,5 л, а затем оставшийся хлороформ упаривают при вакууме 0,6 кПа;

- к полученной густой темно-коричневой кристаллизующейся массе прибавляют этиловый эфир (10:1) до прекращения выпадения осадка;

- осадок растворяют в хлороформе, дважды промывают 5 %-ным раствором карбоната натрия для отделения смолянистых веществ кислотного характера, а затем дважды водой, хлороформ отгоняют;

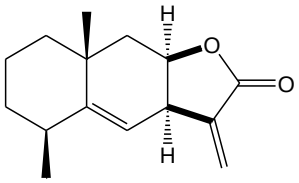
- остаток разбавляют в спирте, добавляют активированный уголь, кипятят в течение нескольких минут и фильтруют; после охлаждения кристаллы отсасывают и вторично перекристаллизовывают из спирта.

Выход тауремизина, в пересчете на воздушно-сухое сырье, составляет 0,2 % [21].

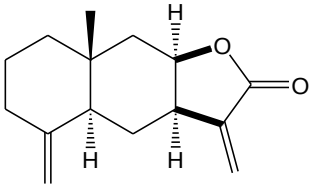
Субстанцию для производства высокоэффективного антималярийного средства «Qinghaosu» (Хингаосу) – сесквитерпенового лактона артемизинина (**3**) по классической технологии получают экстракцией полыни однолетней с последующей колоночной хроматографией. В качестве экстрагента используют неполярные растворители. Существует способ выделения артемизинина (**3**) без применения колоночной хроматографии, для этого надземную часть полыни однолетней экстрагируют этиловым спиртом, затем экстракт отгоняют, полученный остаток реэкстрагируют гексаном. Вытяжку упаривают, остаток растворяют в этилацетате, добавляют активированный уголь для связывания хлорофиллов, отфильтровывают, из полученного фильтрата выкристаллизовывают артемизинин (**3**) [22].

Производство субстанции «Алантон» - очищенной суммы сесквитерпеновых лактонов: алантолактона (**4**) и изоалантолактона (**5**), из девясила высокого (*Inula helenium* L.), по технологии [23] осуществляется путем 2-х кратного экстрагирования корней и корневищ девясила высокого смесью этанола и гексана (1:4) при кипячении, массовое соотношение корней

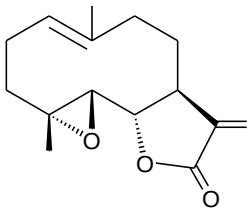
и корневищ с экстрагентом (1:5) в течение 3 ч. Полученные экстракты объединяют, отфильтровывают от механических примесей и упаривают до 1/4 от первоначального объема. При этом выпадает осадок. Для очистки от сопутствующих веществ растворяют в минимальном объеме (50 мл) смеси этанола и гексана (1:4) и сесквитерпеновые лактоны высаживают добавлением чистого гексана до устойчивого помутнения. Максимальное выпадение кристаллов сесквитерпеновых лактонов достигается в течение 24 ч при комнатной температуре. Желтоватые кристаллы очищенной суммы сесквитерпеновых лактонов алантолактона и изоалантолактона, находящихся в количественном соотношении 2:1, с температурой плавления 86-88 °С, получают с применением колоночной хроматографии. В качестве сорбента используется силикагель, элюент - смесь петролейного эфира и этилацетата (9:1), выход конечного продукта составляет 1,9 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье.



(**4**)



(**5**)



(**6**)

Сесквитерпеновый лактон партенолид (**6**), входящий в состав суммарной биологически активной добавки «Пиретрум» («Feverfew»), выпускаемой фирмой MH Pharma Ltd (Великобритания) [24-26] получают по следующей схеме: воздушно-сухое, измельченное сырье надземной части *Tanacetum parthenium* L. исчерпывающе экстрагируют при комнатной температуре 90 %-ным водным этиловым спиртом. Экстракт фильтруют и упаривают под вакуумом, остаток хроматографируют на колонке с силикагелем, в качестве элюента используют дихлорметан. Полученные фракции объединяют, упаривают и рехроматографируют на колонке с силикагелем смесью гексана и дихлорметана.

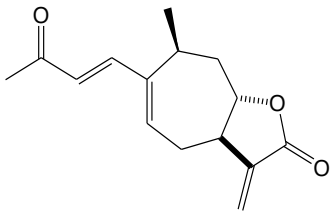
Адсорбционная колоночная хроматография является самым распространенным методом выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов с выраженной биологической активностью. Для хроматографического разделения, которых доминирующим вариантом по-прежнему остается нормально-фазовый вариант жидкостной колоночной хроматографии на силикагеле или окиси алюминия, при элюировании растворителями различной полярности. В последние годы для выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов применяют современные автоматизированные виды препаративной жидкостной хроматографии, а именно, высокоэффективную жидкостную, флеш-колоночную, сверхкритическую флюидную и центробежную хроматографию распределения [27-60].

Центробежная хроматография распределения (ЦХР) – сравнительно конструкторский подход, чтобы избежать проблем, связанных с твердофазными адсорбентами и сохранить химическую целостность смесей, подвергаемых

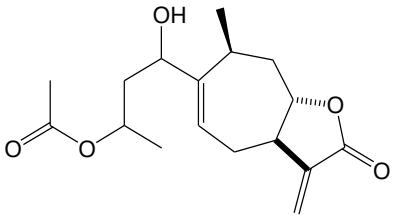
разделению. ЦХР обеспечивает высокую скорость разделения, не требует применения твердых сорбентов и дорогостоящих элюентов, потребление растворителей снижается в 10 раз, что значительно снижает себестоимость целевого продукта.

В настоящее время системы FCPC (быстрый центробежный хроматограф распределения) находят широкое применение, как в области науки, так и в производстве, в мире используется более 100 систем FCPC, из них 60 в Европе, более 40 в США, некоторые во Вьетнаме, Австралии, Индии, Иране, Бразилии, которые применяются для выделения и наработки биологически активных веществ из природного материала, а именно, алкалоидов, стероидов, пептидов, липидов, антибиотиков и т.д.

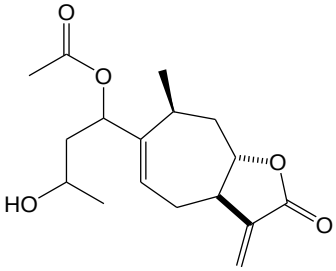
Например, центробежная хроматография распределения была успешно использована для выделения нескольких ксантанолидов (ксантатина (**7**), 4-эпи-ксантанола (**8**) и 4-эпи-изоксантанола (**9**)) из необработанного хлороформного экстракта листьев *Xanthium macrocarpum* var. *glabratum* DC с использованием установки FCPC 5000 (Angers, France) и системы растворителей гептан:этилацетат:метанол:вода (1:1:1:1, об./об.). При этом авторами установлено, что центробежная хроматография распределения более эффективна для препаративного выделения и очистки ксантатина (**7**), 4-эпи-ксантанола (**8**) и 4-эпи-изоксантанола (**9**), чем колоночная хроматография на силикагеле, использование данного метода существенно сократило время разделения и снизило расход растворителей [61].



(**7**)

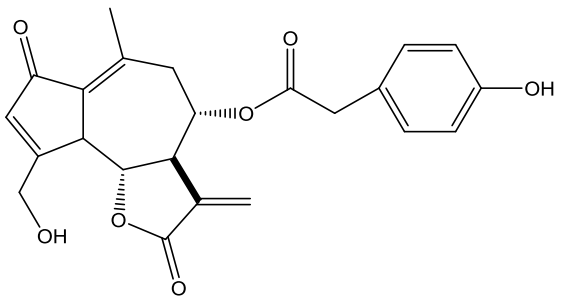


(**8**)

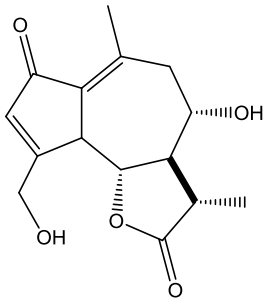


(**9**)

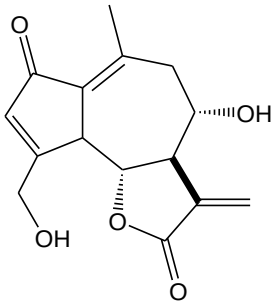
Осуществлена успешная очистка трех сесквитерпеновых лактонов из этилацетатного экстракта корней *Cichorium glandulosum* Boiss. et A. Huet методом высокоскоростной противоточной хроматографии. Разделение проводили в две стадии с применением двух систем растворителей: смесь н-гексан-этилацетат-метанол–вода (1,5:5:2,75:5) и смесь этилацетат-метанол–вода (20:1:20). Из 166 мг этилацетатного экстракта выделено 19 мг лактукопикрина (**10**) с помощью первой системы растворителей и 10 мг 11β,13-дигидролактуцина (**11**) и 16 мг лактуцина (**12**) с помощью второй системы растворителей. Все выделенные соединения имеют чистоту выше 94 % (по данным ВЭЖХ) [62].



(**10**)

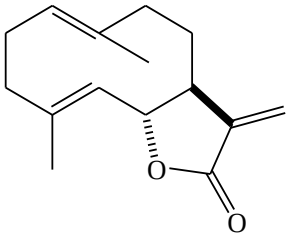


(**11**)

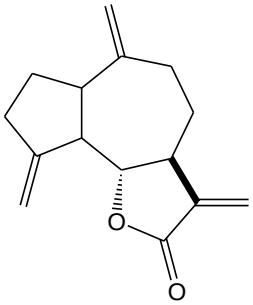


(**12**)

Применение препаративного высокоскоростного противоточного хроматографа позволило выделить из экстракта *Aucklandia lappa* Decne два сесквитерпеновых лактона костунолид (**13**) и дегидрокостуслактон (**14**). Для разделения использовалась система растворителей состоящая из петролейного эфира-метанола-воды (5:6,5:3,5, об./об./об.), верхняя фаза – стационарная. Разделением в этой системе 110 мг суммарного экстракта (петролейного) *Aucklandia lappa* Decne получили 35,7 мг костунолида (**13**) и 43,6 мг дегидрокостуслактона (**14**) с чистотой более 99 % [63].



(**13**)



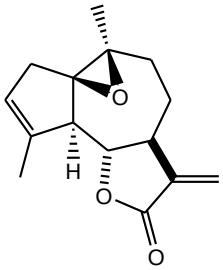
(**14**)

В холдинге «Фитохимия» проведена работа по определению оптимальных условий выделения и очистки фармакологически активных сесквитерпеновых лактонов из CO_2–экстракта полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.) с применением центробежной хроматографии распределения. CO_2–экстракт полыни гладкой.

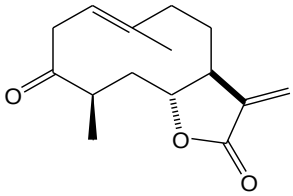
Двухфазная система для разделения CO_2–экстракта полыни гладкой подобрана согласно коэффициенту распределения (K) сесквитерпенового лактона арглабина (**15**), значение К арглабина оценивали по анализу методом ВЭЖХ. Оптимальной системой растворителей для выделения арглабина (**15**) и сопутствующих сесквитерпеновых лактонов арголида (**16**) и дигидроарголида (**17**) определена смесь гептан:этилацетат:ацетонитрил (2:1:2, об./об.), в качестве подвижной фазы использован нижний слой.

В ходе разделения CO_2-экстракта полыни гладкой на производственной установке FCPC 5000 собрали 4 фракции. После перекристаллизации фракции 3 получили арглабин (**15**) с чистотой не менее 99 % по данным ВЭЖХ, выход которого составил 20,0 %, в пересчете на массу CO_2-экстракта полыни гладкой. Флеш-колоночной хроматографией, после водно-спиртовой обработки фракции 2, проведена препаративная наработка сесквитерпеновых лактонов (**16**) и (**17**),

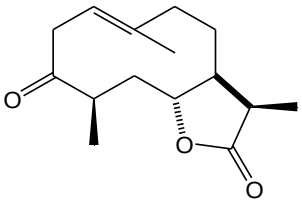
при этом выход арголида (**16**) составил 9,2 %, выход дигидроарголида (**17**) – 4,5 %, в пересчёте на массу фракции 2, чистота полученных соединений составила 99 % по данным ВЭЖХ.



(**15**)



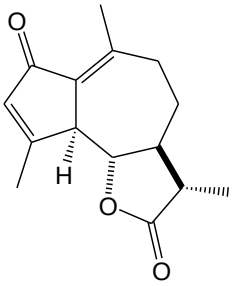
(**16**)



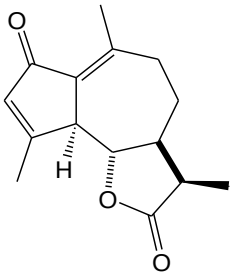
(**17**)

На основе полученных результатов разработана и внедрена в производство технология получения сесквитерпенового лактона арглабина - субстанции препарата «Арглабин» противоопухолевого действия, из CO_2-экстракта полыни гладкой, с использованием центробежной хроматографии распределения, применение которой повышает производительность в 10 раз, выход целевого продукта – в 1,3 раза, потребление растворителей снижается в 10 раз, исключены токсичные растворители, трудозатраты снижаются в 3 раза, что значительно снижает себестоимость целевого продукта [64-69]. Кроме того, данная технология позволяет осуществлять препаративную наработку сесквитерпеновых лактонов арголида и дигидроарголида для химической модификации.

Экспериментально установлено, что аналогичная система растворителей гептан:этилацетат:ацетонитрил (2:1:2, об./об.) также является оптимальной для выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов леукомизина (**18**) и ахиллина (**19**) из CO_2-экстракта полыни беловатой (*Artemisia leucodes* Schrenk).



(**18**)



(**19**)

Разделение CO_2-экстракта полыни беловатой (*Artemisia leucodes* Schrenk.), собранной в пустыне Мойынкум Жамбылской области, проводили на производственной установке FCPC 5000, подвижная фаза – нижний слой. Фракции, содержащие ахиллин (**19**) по данным ВЭЖХ, были объединены, упарены и перекристаллизованы, выход ахиллина составил 13,0 % в пересчете на массу CO_2-экстракта полыни беловатой, чистота 98 % по данным ВЭЖХ.

В аналогичных условиях осуществляли разделение CO_2-экстракта полыни беловатой (*Artemisia leucodes* Schrenk.), собранной в окрестностях поселка

Арысь Южно-Казахстанской области, при этом выход леукомизина (**18**) составил 14,0 % в пересчете на массу CO_2-экстракта полыни беловатой, чистота 98 % по данным ВЭЖХ.

В результате проведенных исследований, разработана и внедрена в производство технология выделения и очистки сесквитерпенового лактона леукомизина - субстанции лекарственного средства «Атеролид» гиполипидемического действия, из CO_2-экстракта полыни беловатой с применением центробежной хроматографии распределения, при этом повышается производительность в 5,4 раз, потребление растворителей снижается в 6 раз, исключены токсичные растворители, что значительно снижает себестоимость целевого продукта [70-73].

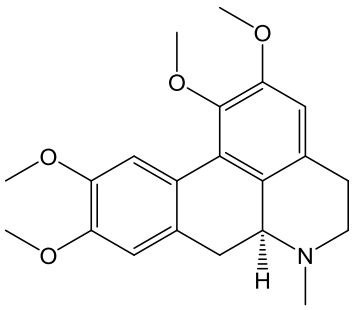
1.3 Технология получения биологически активных алкалоидов из растительного сырья

Разделение алкалоидов основано на использовании специфических физико-химических свойств отдельных алкалоидов (растворимости, температуры кипения, основности, полярности, образования химических производных). Сорбция алкалоидов на тонкодисперсных молекулярных сорбентах и их избирательное элюирование (десорбция) с использованием элюотропного ряда растворителей (разделение алкалоидов на основе их различной полярности) является одним из семи основных методов разделения алкалоидов [74-93].

Колоночную хроматографию часто используют для отделения, как балластных веществ, так и сопутствующих алкалоидов, например, при производстве глауцина гидрохлорида. Глауцин (**20**) – алкалоид, выделяемый из травы мачка желтого (*Glaucium flavum* Crantz), обладает противокашлевым действием.

Технология производства глауцина гидрохлорида включает следующие этапы:

- Измельченный растительный материал смачивают 4 % водным раствором гидроксида натрия и экстрагируют бензином.



(**20**)

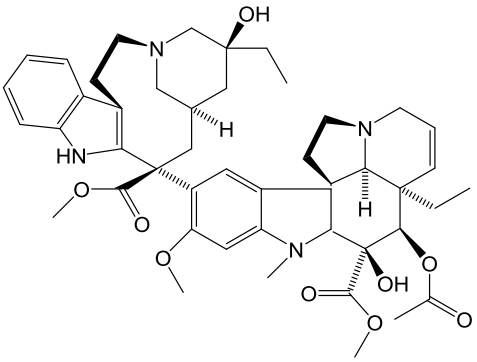
- Бензиновую вытяжку обрабатывают 10 % водным раствором серной кислоты, затем к полученной водной вытяжке добавляют порошок натрия хлорида в соотношении 1:7, в результате в растворе образуется глауцина гидрохлорид. Выпавший хлопьевидный осадок глауцина гидрохлорида

экстрагируют из суспензии хлороформом. Хлороформную вытяжку промывают 8 % водным раствором натрия гидроксида. Глауцин из гидрохлорида переходит в основание и остается в хлороформном растворе.

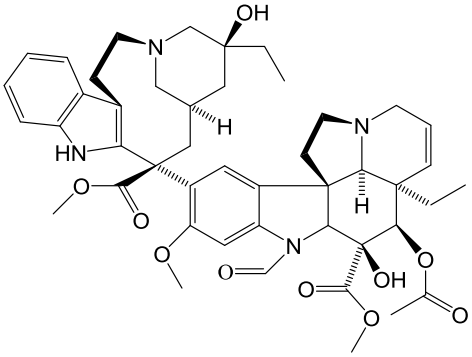
- Хлороформный раствор пропускают через колонку с оксидом алюминия I степени активности. Колонку дополнительно промывают хлороформом.

- Полученный при элюировании хлороформный раствор глауцина упаривают в пленочном ваккум-выпарном аппарате до 1/100 первоначального объема, основание глауцина осаждают двойным количеством петролейного эфира. Осадок отфильтровывают в токе инертного газа. Глауцина гидрохлорид получают растворением основания глауцина в метиловом спирте и добавлением к раствору концентрированной соляной кислоты до pH = 4-5 (не ниже, так как происходит осмоление алкалоида). Кристаллизацию проводят при температуре 5-8 ºС. Выпавший осадок отфильтровывают в токе инертного газа, промывают небольшим количеством ацетона и эфира, далее сушат в вакуум-сушильном шкафу. Общий выход препарата составляет около 75 % [94].

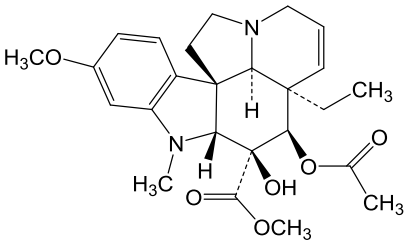
Хроматографическое разделение применяют в получении винбластина (**21**), винкристина (**22**), виндолина (**23**) из *Vinca minor* L., т.е. в тех случаях, когда активные компоненты являются минорными. Если требуется очистить сырой продукт от полярных примесей, применяют фильтрацию через слой окиси алюминия [95, 96].



(**21**)



(**22**)

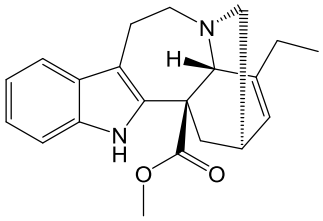


(**23**)

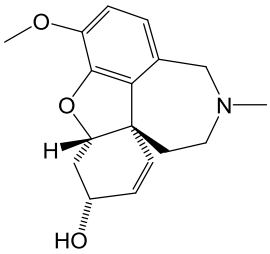
Таким образом, колоночная хроматография на окиси алюминия является одним из распространенных способов выделения и наработки алкалоидов различных групп, который используется при производстве лекарственных препаратов на их основе. Также для выделения алкалоидов применяются гель-фильтрация, препаративная ВЭЖХ. В последние годы для выделения и очистки

алкалоидов применяют современные автоматизированные виды препаративной жидкостной хроматографии, а именно, центробежную хроматографию распределения [97-102].

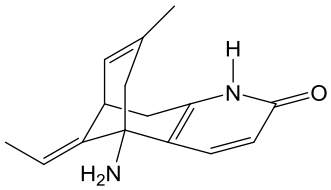
Применение технологии изменения pH фактора градиента позволило выделить следующие биологически активные соединения: индоломонотерпеновые алкалоиды - винбластин (**21**), виндолин (**23**), катарантин (**24**) – основы противоопухолевых препаратов из *Catharanthus roseus* G. Don (*Apocynaceae*), галантамин (**25**) (ингибитор ацетилхолинэстеразы) из *Narcissus carlton* L. (*Amaryllidaceae*) и гуперзины А (**26**) и В (ингибитор ацетилхолинэстеразы) из *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis. (*Lycopodiaceae*) [103].



(**24**)

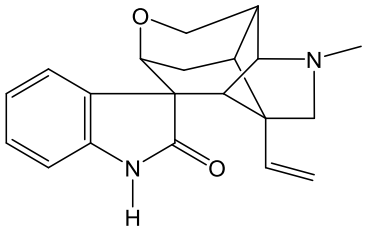


(**25**)

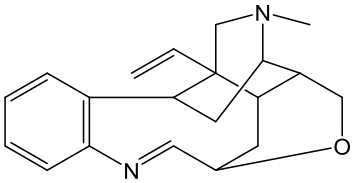


(**26**)

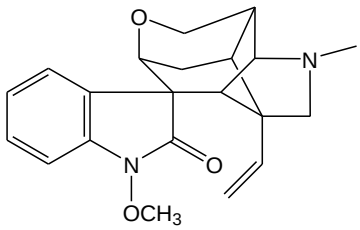
Так же применение технологии изменения градиента pH-фактора позволило выделить биологически активные алкалоиды из *Gelsemium elegans* Benth. Для разделения использовалась двухфазная система растворителей, состоящая из метил-трет-бутиловый эфир:ацетонитрил:вода (3:1.5:4, об./об.), для контроля pH среды в водную фазу прилили соляную кислоту (10 ммоль), в органическую фазу прилили триэтиламин (20 ммоль). При разделении 1,5 г необработанного экстракта *G. elegans* Benth. выделили 312 мг гелземина (**27**), 420 мг коумина (**28**) и 195 мг гелсеверина (**29**), с чистотой в 94,8 %, 95,9 % и 96,7 % соответственно (по данным ВЭЖХ) [104].



(**27**)



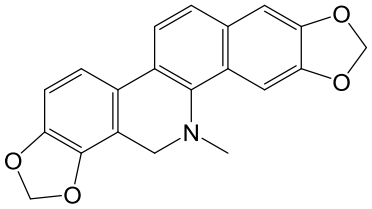
(**28**)



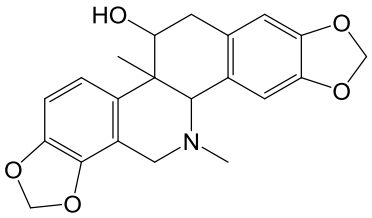
(**29**)

Высокоскоростная противоточная хроматография (HSCCC) успешно применена для препаративного выделения и очистки алкалоидов из *Corydalis bungeana* Turcz. Для разделения методом HSCCC выбрана система $CHCl_3$-MeOH-0,3 M HCl (4:3:2, об./об.), с использованием верхней фазы в качестве неподвижной и элюированием нижней фазой. В результате выделены сангвинарин (**30**) (10 мг), коринолин (**31**) (25 мг), протопин (**32**) (20 мг), коринолоксин (**33**) (18 мг) и 12-гидроксикоринолин (**34**) (8 мг) из 200 мг

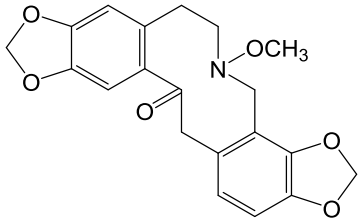
неочищенного экстракта. Чистота, выделенных алкалоидов составила 94-99 % (по результатам ВЭЖХ) [105].



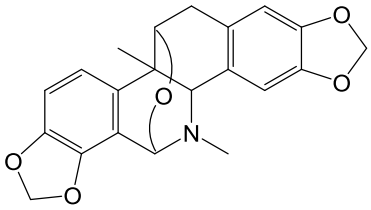
(**30**)



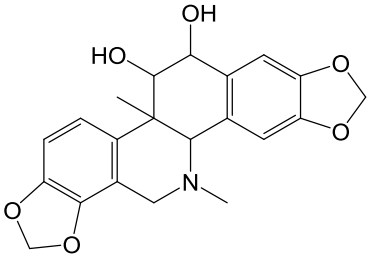
(**31**)



(**32**)



(**33**)

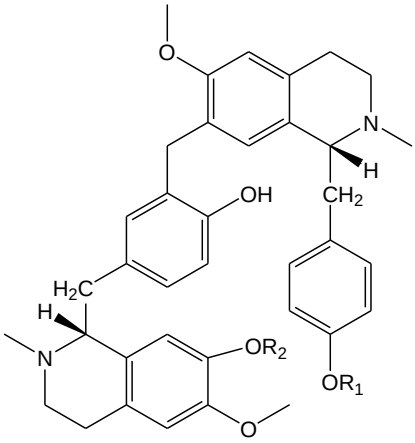


(**34**)

Разработан новый высокоскоростной способ хроматографии для полупрепаративного разделения и очистки алкалоидов из семян *Nelumbo nucifera* Gaertn. с помощью режима контроля показателя pH градиента элюирования. Диэтиловый эфир был использован в качестве неподвижной фазы, в качестве подвижной фазы использовали буферный раствор с pH от 7,5 до 7,2 Na_2HPO_4/NaH_2PO_4. Были выделены 33 мг линзинина (**35**), 42 мг изолинзинина (**36**) и 67 мг неферина (**37**) из 200 мг неочищенного экстракта. Чистота полученных алкалоидов составила более 98 % [106].

В работе [107] проведено разделение алкалоидов из семян *Nelumbo nucifera* Gaertn. с применением противоточной хроматографии при контроле показателя pH. Для разделения использовали два вида двухфазных систем: первая – метил-трет-бутиловый эфир-вода (1:1, об./об.), с добавлением в органический слой 10 мМ триэтиламина, а в водный слой 5 мМ соляной кислоты, при этом выделен частично только неферин (**37**). Вторая система состояла из *н*-гексан-этилацетат-метанол-вода (5:5:2:8, об./об.), 10 мМ триэтиламин приливали в органическую стационарную фазу и 5 мМ HCl в водную подвижную фазу, при одностадийном разделении 2,5 г сырого экстракта в течение 7 ч, получили 151 мг линзинина (**35**), 118 мг изолинзинина (**36**) и 572 мг неферина (**37**) с чистотой 93,0 %, 95,1 % и 97,0 %, соответственно.

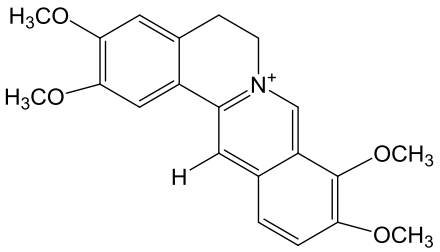
В работе [108] приведено сравнение механизма разделения четвертичных алкалоидов с использованием регулирования показателя pH со стандартным высокоскоростным ССС-разделением. При разделении 1,2 г неочищенного образца из *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang получили 129 мг дегидрокоридалина (**38**) и 12 мг палматина (**39**), с чистотой 94 и 92 %, соответственно. Выход, в пересчете на экстракт составил 85 и 86 % соответственно.



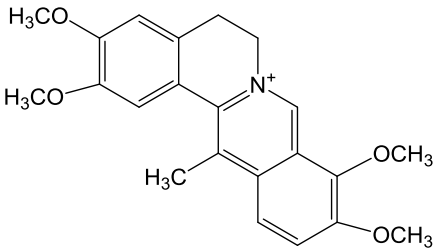
	R_1	R_2
(**35**)	H	CH_3
(**36**)	CH_3	H
(**37**)	CH_3	CH_3

(**35-37**)

Авторами [109] использована высокоэффективная жидкостная хроматография для выделения и очистки алкалоидов из *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang. Эксперименты проводились в режиме офф-лайн, используя препаративную колонку с pH 3,5 в первом разделении и pH 10,0 во втором разделении. При первом разделении контроль осуществляли с применением УФ-детектора, во втором УФ- и масс-спектроскопию. При первом разделении выделены два чистых алкалоиды и девять фракций, содержащих их смесь. При втором разделении этих фракций выделено еще 6 чистых алкалоида.

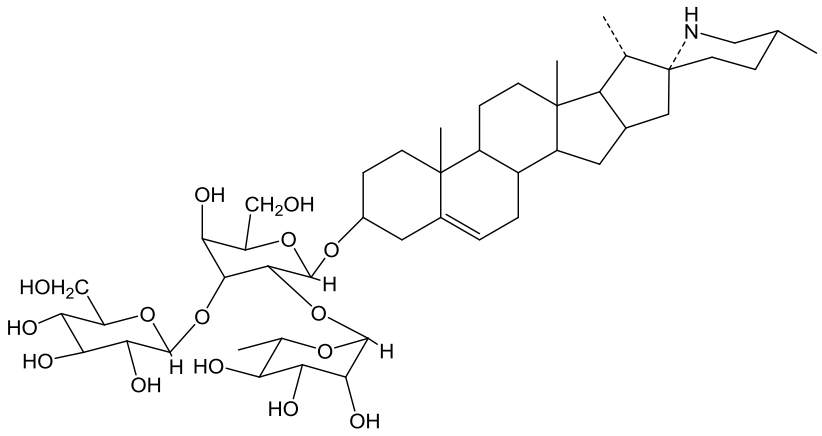


(**38**)

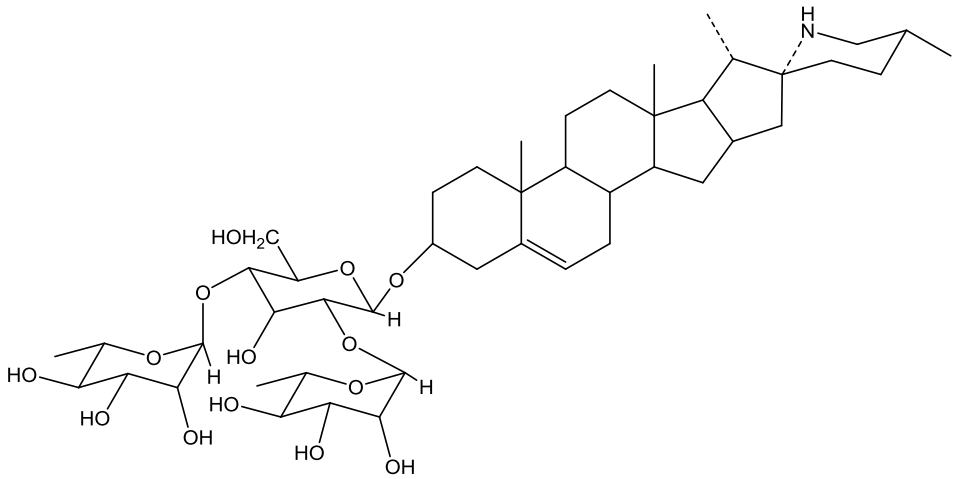


(**39**)

Центробежная хроматография распределения с контролем показателя pH успешно применена при разделении сложных полярных стероидных гликоалкалоидов с близким значением R_f, непосредственно из сырого экстракта *Solanum xanthocarpum* Schrad & Wendl. Эксперимент проводился с системой двухфазного растворителя, состоящего из этилацетата-бутанола-воды (1:4:5, об./об.), где триэтиламин (5 мМ) добавляли к верхней органической подвижной фазы и трифторуксусную кислоту (10 мМ) к водному слою стационарной фазы в качестве фиксатора. Разделение 1 г неочищенного экстракта методом центробежной хроматографией распределения привело к двум различным pH-зонам. Фракции, собранные в зоне pH-1 содержали 72 мг золазолина в то время как фракции, собранные в зоне pH-II были нечистыми, при рехроматографии методом жидкостной хроматографии получили 30 мг золазолина (**40**) и 15 мг золамаргина (**41**), со степенью чистоты 93,3 % и 91,6 % соответственно [110].

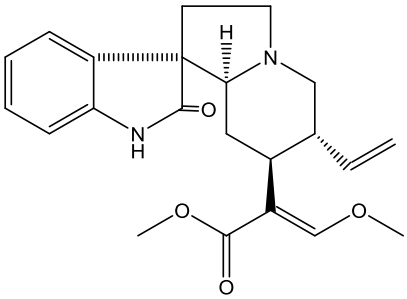


(**40**)

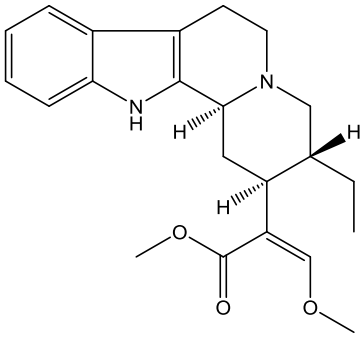


(**41**)

Жидкость-жидкостная хроматография может применяться также и для повышения содержания целевых компонентов в экстракте, так авторами [111] при выделении 7 минорных индольных алкалоидов из спиртового экстракта *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil на первом этапе суммарный экстракт растворяют в верхней фазе системы растворителей: гексан:этилацетат: метанол:вода (3:7:1:9, об./об.) с добавлением 10 мМ триэтиламина в соотношении 1:20 (м/об.) и экстрагируют нижней фазой также с добавлением 10 мМ триэтиламина, нижний слой отбрасывают. Верхний слой обрабатывают нижней фазой с добавлением 10 мМ соляной кислоты, отбрасывают верхний слой. Кислотную вытяжку обрабатывают 25 %-ным раствором аммиака до pH 10 и упаривают на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют в воде, экстрагируют этилацетатом, органический слой упаривают, получают сумму экстрактивных веществ с повышенным в 3,4 раза содержанием минорных целевых алкалоидов. При разделении обогащенной смолки в вышеприведенной системе растворителей выделено два алкалоида с чистотой более 97 % - кореноксеин (**42**), хирсутин (**43**), чистота остальных пяти алкалоидов не превышала 93 %.

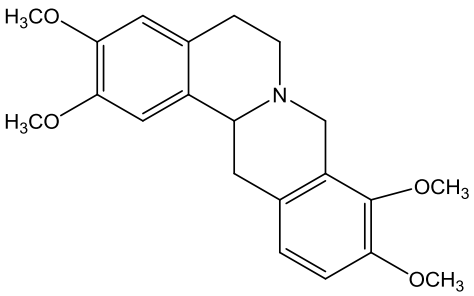


(**42**)

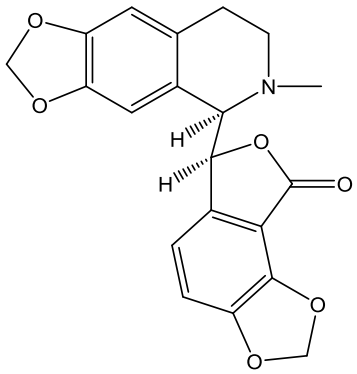


(**43**)

Для препаративного выделения алкалоидов из сырого экстракта *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. успешно использована pH-зонная противоточная хроматография с использованием спиральной планетарной центрифуги. Эксперимент проводили с применением двухфазной системы растворителей - смеси метил(трет-бутил)эфир-ацетонитрил-вода (2:2:3), где триэтиламин (5-10 мМ) добавлен к верхней органической неподвижной фазе как удерживатель, а хлористоводородная кислота (5-10 мМ) добавлена к водной подвижной фазе как элюирующий агент. Из 3,1 г сырого экстракта получено 495 мг протопина, 626 мг тетрагидропальматина (**44**) и 423 мг бикукуллина (**45**), каждого с чистотой более 93 % по данным ВЭЖХ [112].

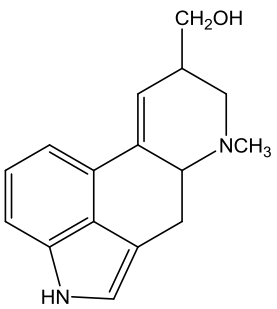


(**44**)

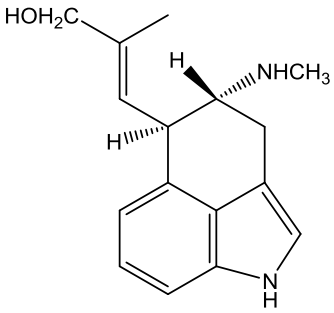


(**45**)

Центробежная распределительная хроматография в режиме pH-зонной очистки был успешно применен к разделению алкалоидов, прямо из неочищенного экстракта из *Ipomoea muricata* (L.) Jacq. Эксперимент проводился с системой растворителей двухфазной состоящей из метил-трет-бутилового эфира-ацетонитрил-вода (4:1:5, об./об.), где добавляют триэтиламин (10 мМ) в верхней стационарной фазы органического в качестве фиксатора и трифторуксусной кислоты (10 мМ) в водной подвижной фазы. Из 4 г сырого экстракта были получены 210 мг лизергола (**46**) и 182 мг ханоклавина (**47**) с чистотой 97 % и 79,6 % соответственно. Извлечение из экстракта составило более 95 %. Строение доказано на основании их ^{1}H, ^{13}C ЯМР данных [113].

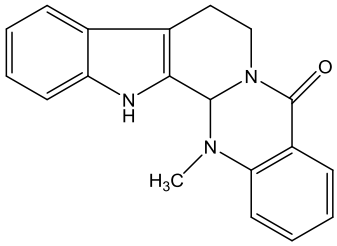


(**46**)

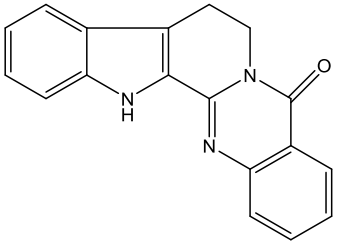


(**47**)

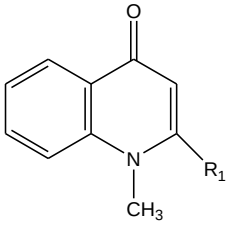
Метод высокоскоростной противоточной хроматографии с двухфазной системой растворителей - смеси н-гексан-этилацетат-метанол-вода (5:5:7:5), использован для выделения и очистки алкалоидов из китайского лекарственного растения *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Было получено пять алкалоидов и выделено 28 мг эводиамина (**48**), 19 мг рутаэкарпина (**49**), 21 мг эвокарпина (**50**), 16 мг 1-метил-2-[(6Z,9Z)]-6,9-пентадекадиенил-4-(1H)-хинолона (**51**) и 12 мг 1-метил-2-додецил-4-(1H)-хинолона (**52**) из 180 мг сырого экстракта при одноступенчатом разделении с чистотой 98,7 %, 98,4 %, 96,9 %, 98,0 % и 97,2 %, соответственно по данным ВЭЖХ [114].



(**48**)

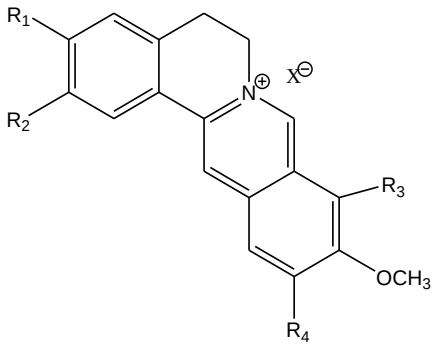


(**49**)



(**50**-**52**)

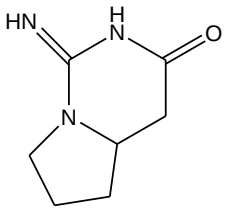
Высокопроизводительная центробежная распределительная хроматография (HPCPC) была успешно применена для разделения четырех алкалоидов, а именно палматина (**39**), ятроризина (**53**), колумбамина (**54**) и псевдоколумбамина (**55**), из метанольного экстракта, массой 1,47 г, *Enantia chlorantha* Oliv. Для их изоляции были подобраны две двухфазные системы растворителей, состоящие из дихлорметан-метанол-вода (48:16:36, об./об.). Водная фаза была неподвижной фаза, а органическая фаза использовалась в качестве подвижной фазы. Первая система, содержащая перхлорат калия, позволила выделить 600 мг палматина (**39**) и получить 146 мг смеси, содержащей только ятроризин (**53**), колумбамин (**54**) и псевдоколумбамин (**55**). Вторая двухфазная система, подщелачиванная гидроксидом натрия была использована, чтобы разделить эту смесь компонентов. Эта система применялась для очистки 70 мг смеси и позволила получить 16 мг ятроризина (**53**) и 13 мг колумбамина (**54**). Для получения псевдоколумбамина (**55**) (16 мг) режим элюирования был остановлен и проведена замена стационарной и подвижной фаз: водная фаза, стала подвижной фазой, а органическая – стационарной [115].



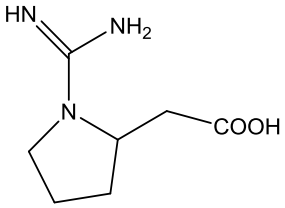
	R_1	R_2	R_3	R_4
(**53**)	OH	OCH_3	OCH_3	H
(**54**)	OCH_3	OH	OCH_3	H
(**55**)	OCH_3	OH	H	OCH_3

(**53-55**)

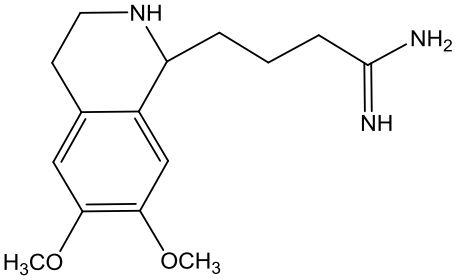
В продолжение работ по исследованию азотистых метаболитов из видов *Cimicifuga/Actaea*, были выделены и охарактеризованы из корней *Cimicifuga racemosa* L. три новых гуанидиновых алкалоида. Из них циклцимипронидин (**56**) и метиловый эфир цимипронидина (**57**) являются родственные примеси цимипронидина, тогда как допаргин (**58**) представляет собой производное допамина [116].



(**56**)

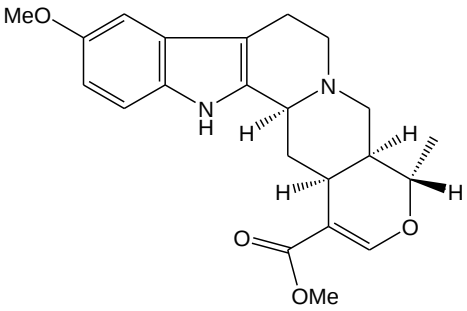


(**57**)

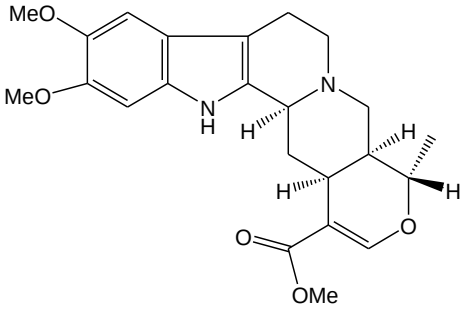


(**58**)

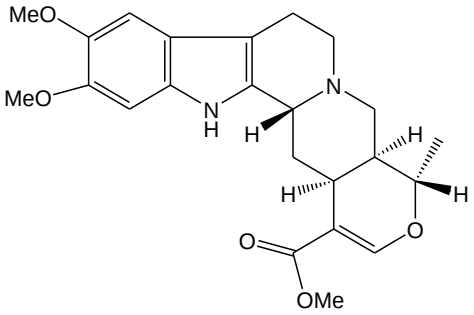
В работе [117] применена противоточная хроматография с контролем показателя pH среды для разделения дихлорметанового экстракта коры *Aspidosperma rigidum* Rusby (*Apocynaceae*). В качестве системы растворителей использовали смесь метил-трет-бутилового эфира и воды с различными концентрациями триэтиламина в органической стационарной фазе и муравьиной или соляной кислот в водной подвижной фазе. Для разделения использовали по 200 мг экстракта, при этом выделили и идентифицированы три основных алкалоида: 3α-арицин (**59**) (17 мг), изорезерпилин (**60**) (22 мг) и 3β-резерпилин (**61**) (40 мг), с относительной чистотой 79 %, 89 % и 82 % соответственно. Индольные алкалоиды 3α-арицин и изорезерпилин выделены из данного вида впервые.



(**59**)

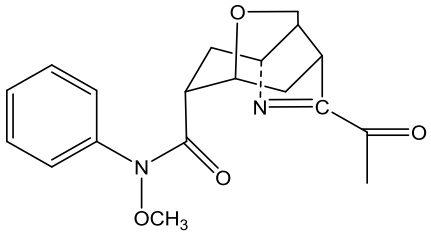


(**60**)

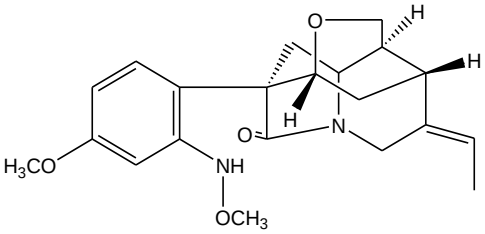


(**61**)

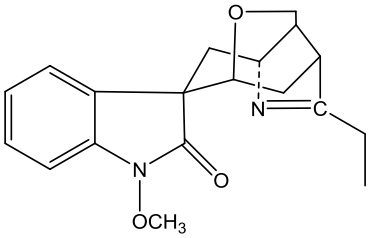
Используя метод противоточной хроматографии с контролем pH среды для разделения алкалоидов стеблей *Gelsemium elegans* Benth. в смеси гексан-этилацетат-метанол-вода (3:7:1:9, об./об.) с добавлением триэтиламина в органический слой (стационарная фаза) и соляной кислоты в водный слой (подвижная фаза), из 4,5 г неочищенного этанольного экстракта выделены шесть оксинодольных алкалоидов: 420 мг 19-ксо-гелзеницина (**62**), 456 мг гелземина, 723 мг коумина, 379 мг 11-метоксигелземамида (**63**), 342 мг гелзеницина (**64**) и 318 мг хумантенина (**65**). Идентификацию алкалоидов проводили с применением ^{1}H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии [118].



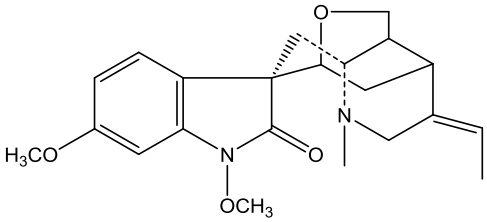
(**62**)



(**63**)

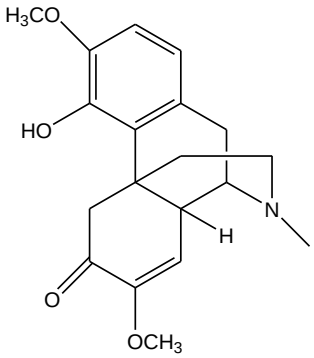


(**64**)

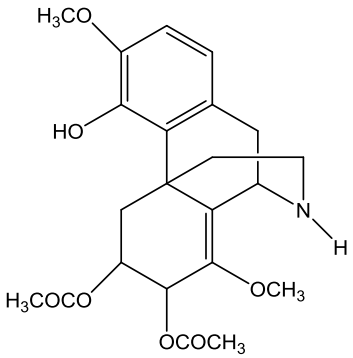


(**65**)

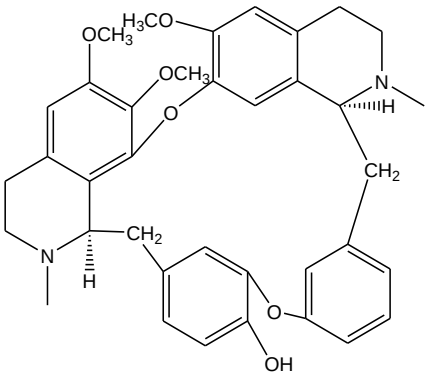
Противоточная хроматография с контролем показателя pH среды при разделении экстракта *Stephania cepharantha* Hayata, полученного при экстрагировании верхним слоем смеси гексан-этилацетат-метанол-вода (1:1:1:1, об./об./об./об.), содержащей 10% триэтиламин при 50 °C и 400 Вт мощности облучения в течение 10 мин, позволила выделить 5,7 мг синоменина (**66**), 8,3 мг 6,7-ди-О-ацетилсинококулина (**67**), 17,9 мг бербамина (**68**), 12,7 мг изотетрандрина (**69**) и 14,6 мг цефарантина (**70**) с чистотой 96,7 %, 93,7 %, 98,7 %, 97,3 % и 99,3 %, соответственно [119].



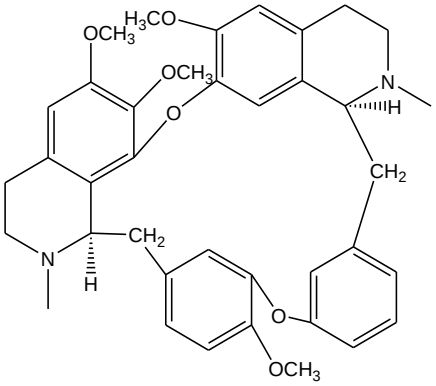
(66)



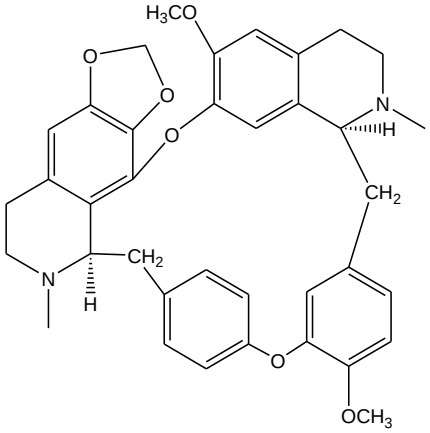
(67)



(68)



(69)



(70)

Таким образом, технологии выделения и очистки биологически активных веществ сесквитерпеновых лактонов и алкалоидов достаточно долгий, трудоемкий многостадийный процесс, требующий использования большого количества дорогостоящих, зачастую, токсичных органических растворителей. Поэтому, для получения сесквитерпеновых лактонов и алкалоидов с практически ценными свойствами в необходимом количестве и соответствующего качества, необходимо применение современных хроматографических методов.

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, в последнее время, центробежная хроматография распределения получает широкое распространение как 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 (таблица 1) [120, 121].

Таблица 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	исполь-зуется	исполь-зуется	исполь-зуется	исполь-зуется	не исполь-зуется
Процент возврата пробы	< 100 %	< 100 %	< 100 %	< 100 %	100 %
Качество растворителя	высокое	высокое	высокое	высокое	низкое
Потребление растворителя	большое	большое	большое	большое	малое
Подготовка пробы	водно-спиртовая обработка	водно-спиртовая обработка	водно-спиртовая обработка	водно-спиртовая обработка	фильтро-вание
Производст-венные расходы	высокие	очень высокие	очень высокие	высокие	невысокие

Технология центробежной хроматографии распределения применяется в исследованиях университетов Германии, США, Франции, Канады, Испании, Бельгии и Нидерландов. А также находит широкое применение на производстве ряда известных компаний: Chemistry and Petrochemistry Institute of Quebec (CEPROCQ) (Канада), ID Mer (Франция), Pierre Fabre (Франция), Bionorica (Германия), Pharmpur GmbH (Германия), Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (CIMAP) (Индия), Indena S.p.a (Италия), Nestlé (Switzerland), Kraft Food Inc. (США), Merck (США), AG/Bioanalytik (Германия), Schwabe (Karlsruhe, Германия), Weihenstephan (Германия), HWI Analytical Gmbh (Rheinzabern, Германия), Sanofi-Aventis (Frunkfurt, Германия), Bionorica (Neumark, Германия), Pharmpur GmbH (Konigsbrunn, Германия), Institute Bernburg (Германия), Indena (Settala-MI, Италия), Bachem AG (Budendorf, Швейцария), Nestle (Lausanne, Швейцария), Philip Morris (Marly, Швейцария), G-Pharm (Sittingbourne, Великобритания), Shell (Chester, Великобритания).

Вследствие этого, разработка эффективных, экономичных и экологически безопасных технологий выделения и очистки фармакологически активных веществ, с применением современных хроматографических методов, является актуальной и приоритетной задачей.

Таким образом, стандартные образцы являются одним из важнейших звеньев обеспечения контроля качества лекарственных средств. Для фармацевтических СО характерен следующий «жизненный цикл». Первоначально фирма-разработчик выводит на рынок оригинальный препарат.

Параллельно эта же фирма разрабатывает СО действующего вещества этого препарата. При регистрации такого ЛС, в соответствии с требованиями, для данного СО предоставляется достаточно большой объем информации, которая должна гарантировать его качество. В целях защиты потребителя, на данный препарат разрабатывается фармакопейная монография, которая устанавливает минимальные требования к качеству, обязательные для всех лекарств, зарегистрированных на рынке страны. Одновременно происходит разработка соответствующих фармакопейных СО, необходимых для контроля качества указанного лекарственного средства. Качество фармакопейных СО регламентируется фармакопеей, стандарты которой обязательны для регистрирующих и контролирующих органов [6].

Фармакопейные стандартные образцы веществ растительного происхождения предлагаются фармакопеями ближнего и дальнего зарубежья в небольшом количестве, из-за сложной химической структуры этих субстанций, и трудности их получения, это непростая задача.

Отдельным сложным вопросом является анализ стандартных образцов растений – источников ФСО растительного происхождения. При их идентификации часто недостаточно только химического анализа, но также нужны макроскопические и/или микроскопические профили сырья. Так называемые стандартные образцы растительного происхождения (HDRS - herbal drug reference standards), охарактеризованные по совокупности указанных видов анализа. На данном этапе они только появляются и ещё не широко доступны.

Поскольку в АО «МНПХ «Фитохимия» проводится разработка оригинальных лекарственных средств растительного происхождения: «Хартинол» противовирусного, «Саусалин» противопаразитарного и «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия.

Гроссгемин, цинаропикрин и гармин необходимы в качестве отечественных стандартных образцов ГФ РК для поэтапного контроля качества фармацевтического производства выше перечисленных оригинальных лекарственных средств: контроль на входе – контроль качества растительного сырья, промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции, и контроль на выходе, то есть, качество готовых лекарственных форм.

Поэтому разработка стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля производства и оценки качества оригинальных лекарственных средств растительного происхождения, включающая подробное описание растительного сырья, разработку нового способа и технологии получения СО, доказательство подлинности СО, разработку нормативной документации, в виде проектов АНД и лабораторных регламентов на получение, является актуальной и приоритетной задачей.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

2.1 Материалы исследований

В качестве материалов использованы: лекарственное сырье - хартолепис средний трава (*Chartolepis intermedia* Boiss.), гармалы обыкновенной корни (*Peganum harmala* L.); экстракты – густой этилацетатный экстракт хартолеписа среднего, густой спиртовый экстракт гармалы обыкновенной; стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина.

Растворители:

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.

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.

96 % спирт этиловый. C_2H_5OH. (M_r 46.07). 102500. [64-17-5]. 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.

2.2 Методы исследований

Для проведения физико-химических и фармацевтических исследований использованы следующие приборы: быстрый центробежный хроматограф распределения FCPC-200A, FCPC-5000 (Kromaton Technologies, Angers, France), препаративном хроматографе HPLC (Varian, США), спектрометр «Termo Nicolet Avatar-360» (США), спектрофотометр «Helios-β» (Великобритания), жидкостной хроматограф HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series (США), газовый хроматограф «Кристаллюкс 4000М» (Россия), прибор для определения температуры плавления «Boetius» (Германия), масс-спектрометр высокого разрешения Finnigan DMS-8200, элементный анализатор Eurovector 3000.

Физико-химические методы

Центробежная хроматография распределения

Разделение этилацетатного экстракта хартолеписа среднего проведено на установке FCPC-A200, ротор 250 мл, система растворителей гексан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1), проба 2,3 г в 15 мл – верхней (стационарной) фазы и 10 мл – подвижной фазы, 25 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование 220, 254, 360, 460 нм, скорость вращения ротора – 1400 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия.

Разделение спиртового экстракта гармалы обыкновенной проведено с на установке FCPC-A200: ротор 250 мл, система растворителей этилацетат:этанол:вода (5:1:4), проба 0,05 г в 5 мл – верхней (стационарной) фазы, 5 мл – подвижной фазы, 10 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование 280, 301, 360, 380 нм, скорость вращения ротора – 1200 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия.

Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение суммарной фракции, содержащей гроссгемин и цинаропикрин, 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 (50:50). При объемной скорости подачи элюента 4 мл в минуту полное разделение пробы происходит в течение 30 минут, температура колонки комнатная. УФ-детектирование при 204 нм.

Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография

Определение количественного содержания гроссгемина и цинаропикрина в сырье хартолеписа среднего, этилацетатном экстракте хартолеписа среднего, фракциях после разделения этилацетатного экстракта хартолеписа среднего на установке FCPC, в стандартных образцах 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: метанол – вода 1:1 (об/об), скорость подачи элюента 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 204 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Определение количественного содержания гармина в сырье гармалы обыкновенной, спиртовом экстракте гармалы обыкновенной, фракциях после разделения спиртового экстракта гармалы обыкновенной на установке FCPC, в стандартным образце 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: метанол – вода 1:1 (об/об), скорость подачи элюента 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20

мкл. УФ-детектирование при 301 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Газовая хроматография

Количество остаточных растворителей в стандартных образцах гроссгемина, цинаропикрина и гармина определяли на газовом хроматографе «Кристаллюкс 4000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях: колонка капиллярная, размером 30 м х 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана (5:95) толщиной 0.25 мм; газ-носитель аргон скорость подачи 20 мл/мин; скорость подачи водорода 40 мл /мин; скорость подачи воздуха 400 мл/мин; температура колонки 30 ºС; температура детектора 120 ºС; температура испарителя 100 ºС.

ИК-спектроскопия

ИК-спектры стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина регистрировали на спектрометре «Termo Nicolet Avatar-360» (США) в таблетках с калия бромидом, в области от 3800 до 600 $см^{-1}$.

УФ-спектрофотометрия

УФ-спектры стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина снимали на приборе «Helios-β» (Великобритания), в области от 200 до 400 нм.

ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина записаны на спектрометре Bruker DRX-500 (рабочая частота – 500.13 МГц для ^{1}H, 125.76 МГц для ^{13}C, δ-шкала) с использованием стандартных программ фирмы Bruker для регистрации двумерных спектров.

Масс-спектроскопия

Для определения молекулярной массы и элементного состава стандартных образцов гроссгемина и гармина использовали масс-спектрометр высокого разрешения Finnigan DMS-8200 с ионизирующим напряжением 70 эВ (температура испарителя 220°С).

Элементный анализ стандартных образцов гроссгемина и гармина проведен на анализаторе Eurovector 3000.

Фармакопейные методы:

- определение цвета, вкуса, запаха стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина проводили по методике, изложенной в ГФ РК, Т. 1, с. 548;
- определение растворимости стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина в различных растворителях проводили по методике ГФ РК, Т. 1, с. 175;
- определение температуры плавления стандартных образцов гроссгемина

и гармина проводили по методике ГФ РК, Т. 1, с. 16 метод 1а.

Статистическая обработка результатов

При обработке полученных результатов исследований применен метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту (P<0,95). Для определения спецефичности, линейной зависимости, правильности и воспроизводимости методики проведена валидация аналитических методик количественного определения активных компонентов и родственных примесей в лекарственных препаратах в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методов» (ГФ РК); Review Guidance «Validation Chromathographic Methods», Center for Drug Research (CDER), Washington, 1994.

3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО (*CHARTOLEPIS INTERMEDIA* BOISS.) И ГАРМАЛЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PEGANUM HARMALA* L.)

3.1 Идентификация лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.)

Хартолепис средний (*Chartolepis intermedia* Boiss.) – многолетнее растение семейства *Asteraceae,* широко распространенное на территории Европейской части СНГ, в Средней Азии, Казахстане, Западной Сибири. Растет на солонцеватых лугах, в долинах рек и по берегам озер. Встречается во всех районах Казахстана, кроме гор. Встречается во флористических районах: Тоболо-Ишимском, Иртышском, Семипалатиского борового, Прикаспийском, Актюбинском, Тургайском, Зайсанском, Приаральском, Бетпакдалинском, Мойынкумском, Балхаш-Алакольском, Чу-Илийском, Каратауском, в Западном мелкосопочнике, Тарбагатае и Джунгарском Алатау [122].

Растение 50-100 см высотой, корневище деревянистое, ветвистое, в шейке утолщенное. Стебель прямостоящий, тонко-ребристый, слабо паутинисто-опушенный, реже почти голый, негусто усаженный сидячими, золотистыми железками. Листья прикорневые и нижние стеблевые продолговато- или эллиптически-обратно-ланцетные до почти ланцетных, иногда по краю неявственно-зубчатые, 2-6 см шириной, на черешке 4-20 см длинной, остальные продолговато-ланцетные, сидячие, длинно низбегающие на стебель. Корзинки на верхушках стебля и его боковых ветвей, одиночные, собранные в раскидистую кистевидную или кистевидно-щитковидную рыхлую метелку. Обвертка продолговато-яйцевидная, 20-25 мм длинойи 10-15 мм шириной, придатки ее листочков тонкоперепончатые, частично скрывают кожистую часть листочка, у основания с бледно-буроватым маленьким пятном или почти сплошь полупрозрачные. Цветки желтые, хохолок перистый, грязновато – дымчатый, 8-10 мм длины. Семянки буровато-кремовые, 5-6 мм длины и 2 мм ширины. Цветет в августе. Вкус своеобразный горьковатый. Запах слабый травянистый [122].

Существовал нормативный документ (ВАНД РК 42-483-12, РК-ЛС-3№019524), регламентирующий качество лекарственного растительного сырья «Хартолепис средний трава», область применения - сырье для получения лактона гроссгемина.

Поскольку хартолепис средний является возобновляемым источником стандартных образцов не только гроссгемина, но и цинаропикрина, на основе ВАНД РК 42-483-12, исследование показателей качества хартолеписа среднего проводились на 5 сериях опытно-промышленной партии, согласно требованиям ГФ РК.

Основополагающим этапом стандартизации цельного сырья является определение подлинности по внешним и микроскопическим характеристикам.

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично измельченные верхние части стеблей с цветками и листьями. Растение 40-100 см высотой; стебель прямостоящий тонко-ребристый; листья черешковые, жилкование

перистое, форма листа эллиптически-обратно-ланцетные до почти ланцетных, имеются волоски и железки; верхушка листа заостренная; листочки обертки многорядные; цветки желтые; хохолок перистый, грязновато-дымчатый. Лист 3-5 см в длину, 0.3-0.5 см в ширину, жилкование перситое, верхушка листа заостренная, имеются волоски, железки (рисунок 1). Стебель желто-зеленого цвета, ребристый, 2-4 см в длину, 2-3 мм в ширину, имеются волоски и железки (рисунок 2). Соцветие: головка дисковидная 2 см в длину, 2-3.5 см в ширину, семянка 1-5 мм с хохолком 0.5-1 см, листочки обертки многорядные 2-2.5 см (рисунок 3).

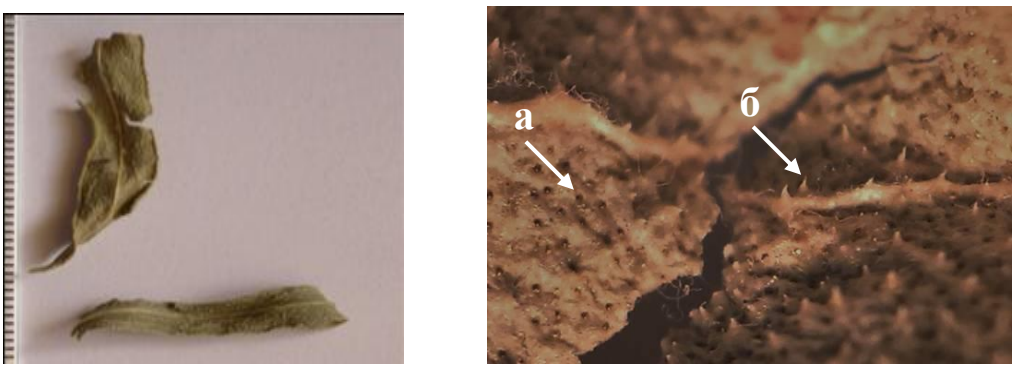


Рисунок 1 – Лист воздушно-сухого сырья хартолеписа среднего;
а – железки, б – волоски

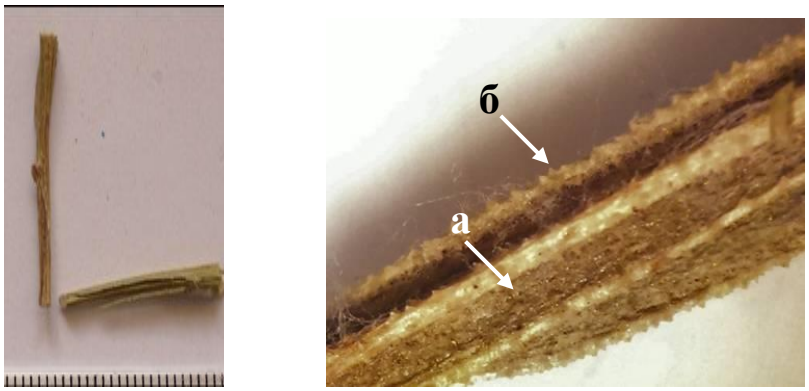


Рисунок 2 – Стебель воздушно-сухого сырья хартолеписа среднего;
а – железки, б – волоски

Измельченное сырье. Кусочки стеблей до 15 см крылатых от низбегающих продолговатой формы, жестких листьев от зеленого до серовато-зеленого цвета. Желтые цветки, собранные в корзинки с хохолком, проходящие сквозь сито диаметром 8 мм.

Идентификация. Микроскопию препарата проводят в соответствие с ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

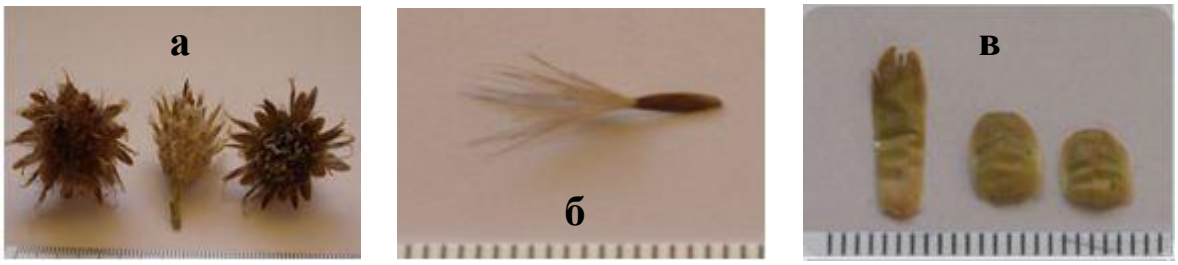


Рисунок 3 – Соцветие воздушно-сухого сырья хартолеписа среднего;
а – головка, б – семянка, в - листочки обертки

При рассмотрении микропрепарата с поверхности видны клетки эпидермиса, покрытые толстым слоем кутикулы; мезофилл состоит из нескольких рядов палисадных клеток, расположенных с обеих сторон губчатой паренхимы, то есть имеет изолатерально-палисадный тип строения; имеются многоклеточные трихомы. На поперечном срезе листа также хорошо видна структура проводящего пучка, состоящая из флоэмы и ксилемы, относится к коллатеральному типу строения. Устьица хаотично расположены на верхней и нижней сторонах листа. Для хартолеписа среднего характерен аномоцитный тип расположения устьиц (рисунок 4).

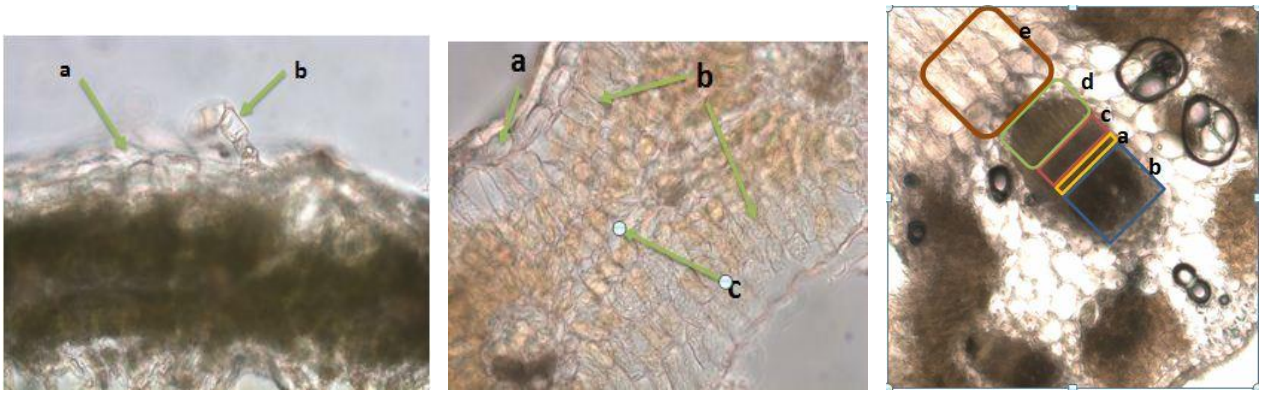


Рисунок 4 – Поперечный срез листа хартолеписа среднего: a–толстый слой кутикулы, b–многоклеточная трихома, c– губчатая паренхима, d–палисадная паренхима, e - ксилема

Диагностические признаки сырья хартолеписа среднего. Эпидермальные клетки листа прямостенные вытянутые. Клетки нижнего эпидермиса мелкие, плотно расположенные. На эпидермисе листа волоски двух типов: простые сегментированные и головчатые, расположенные на обеих сторонах листа с преобладанием на нижней. Мелкие глубоко-сидячие железки в эпидермальных клетках стебля.

Идентификацию сырья также подтверждали, исходя из химического состава хартолеписа среднего, реакцией на наличие в нем терпеноидов. Сумму сесквитерпеновых лактонов выделяли из растительного материала 3-х кратной экстракцией 96 % этанолом. Полученный экстракт показал положительную реакцию на наличие терпеноиды, при прибавлении раствора ванилина в серной кислоте к экстракту, смесь окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Наличие сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и цинаропикрина в сырье устанавливали методом тонкослойной хроматографии (ГФ РК т. I, *2.2.27*).

5 г измельченного сырья (*2.9.12*), помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 96 % спирта этилового, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при температуре 50-60 °С в течение 10 мин, охлаждают. Полученный экстракт фильтруют через ватный тампон. Экстракцию повторяют три раза. Объединенные экстракты упаривают в вакууме до густой массы.

Остаток растворяют в 20 мл 96 % спирта этилового, приливают 10 мл воды, предварительно нагретой до 70 °С, перемешивают и фильтруют (испытуемый раствор.)

На линию старта хроматографической пластинки «Silufol» или «Сорбфил» размером 5 х 15 см наносят в виде полосок по 10 мкг испытуемого и растворов сравнения. Пластинку помещают в камеру с системой растворителей петролейный эфир - этилацетат (1:1). Когда фронт растворителей пройдет около 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе, погружают на 10 секунд в насыщенный раствор калия перманганата, промывают водой очищенной, сушат на воздухе и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться два пятна на уровне пятен растворов сравнения.

Приготовление растворов сравнения. 10 мг гроссгемина (СО) растворяют в 10 мл 96 % этанола. 10 мг цинаропикрина (СО) растворяют в 10 мл 96 % этанола.

Проведен товароведческий анализ пяти серий травы хартолеписа среднего по следующим показателям.

Посторонние примеси. Не более 2 % (ГФ РК I, т. 1, *2.8.2*).

Потеря в массе при высушивании. Не более 13 % (ГФ РК I, т. 1. *2.2.32*). 1.000 г измельченного сырья (*2.9.12*), сушат при температуре 100-105 ^{0}С в течение 2 ч.

Общая зола. Не более 12 % (ГФ РК I, т. 1, *2.4.16*).

Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной. Не более 3,5 % (ГФ РК I, т. 1, *2.8.1*).

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

Сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория *4 В*.

Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (*2.6.12*) не более 10^5 бактерий и не более 10^4 грибов в 1.0 г.

Не более 10^3 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1.0 г.

В 1.0 г сырья не допускается наличие *Escherichia coli* и *Salmonella* в 10.0 г.

Радионуклиды. Сырье должно соответствовать требованию СанПиН №4.01.071.03.

Результаты товароведческого анализа травы хартолеписа среднего приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты товароведческого анализа травы хартолеписа среднего

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота	Радионуклиды
050713	1,10	8,4	12,2	2,87	соответствует	соответствует
060713	1,03	8,1	12,3	2,86	соответствует	соответствует
070713	1,01	8,3	12,1	2,89	соответствует	соответствует
080713	1,02	8,4	12,4	2,88	соответствует	соответствует
090713	1,04	8,3	12,2	2,89	соответствует	соответствует

Количественное определение. Определение количественного содержания гроссгемина и цинаропикрина проводили методом жидкостной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, *2.2.29*).

Около 5,0 г (точная навеска) сырья хартолеписа среднего, проходящего сквозь сито диаметром 8 мм, экстрагировали 30 мл этилацетата. Экстракцию повторяли еще 2 раза. Извлечения объединяли, отгоняли на ротационном испарителе. Остаток количественно перенесли раствором подвижной фазы в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

По 20 мкл полученного фильтрата, раствора стандартного образца гроссгемина и раствора стандартного образца цинаропикрина попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях:

– колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18, 4,6x150 мм с размером частиц 5 мкм;

– подвижная фаза: спирт метиловый – вода в соотношении 1:1;

– детектирование при длине волн 204 нм;

– скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

– температура колонки – 20 ^{0}C.

Содержание гроссгемина (X) в траве хартолеписа среднего, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 25 \cdot (100\text{-}W)};$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков гроссгемина, вычисленное из

хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков гроссгемина, вычисленное из хроматограмм раствора стандартного образца гроссгемина;

m_0 – масса навески стандартного образца гроссгемина, в граммах;

m_1 – масса навески сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Содержание цинаропикрина (X) в траве хартолеписа среднего, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 25 \cdot (100-W)};$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков цинаропикрина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков цинаропикрина, вычисленное из хроматограмм раствора стандартного образца цинаропикрина;

m_0 – масса навески стандартного образца цинаропикрина, в граммах;

m_1 – масса навески сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Приготовление раствора стандартного образца гроссгемина. Около 30,0 мг (точная навеска) гроссгемина, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане и охлаждали. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора стандартного образца цинаропикрина. Около 30,0 мг (точная навеска) цинаропикрина, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане и охлаждали. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм.

Проверка пригодности хроматографической системы:

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику стандартного образца гроссгемина на хроматограмме стандартного образца гроссгемина, должна составлять не менее 3500 теоретических тарелок;
- эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику стандартного образца цинаропикрина на хроматограмме стандартного образца цинаропикрина, должна составлять не менее 4500 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика

стандартного образца гроссгемина на хроматограмме стандартного образца гроссгемина при 5 повторных инжекциях, должно быть не более 2 %;

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика стандартного образца цинаропикрина на хроматограмме стандартного образца цинаропикрина при 5 повторных инжекциях, должно быть не более 2 %;

- коэффициент ассиметрии пика, рассчитанный для пика стандартного образца гроссгемина на хроматограмме стандартного образца гроссгемина должен быть не более 2;

- коэффициент ассиметрии пика, рассчитанный для пика стандартного образца цинаропикрина на хроматограмме стандартного образца цинаропикрина должен быть не более 2.

Содержание гроссгемина в сухом сырье должно быть не менее 0.05 %, цинаропикрина не менее 0.20 %.

На рисунке 5 представлена хроматограмма количественного определения гроссгемина и цинаропикрина в сырье хартолеписа среднего.

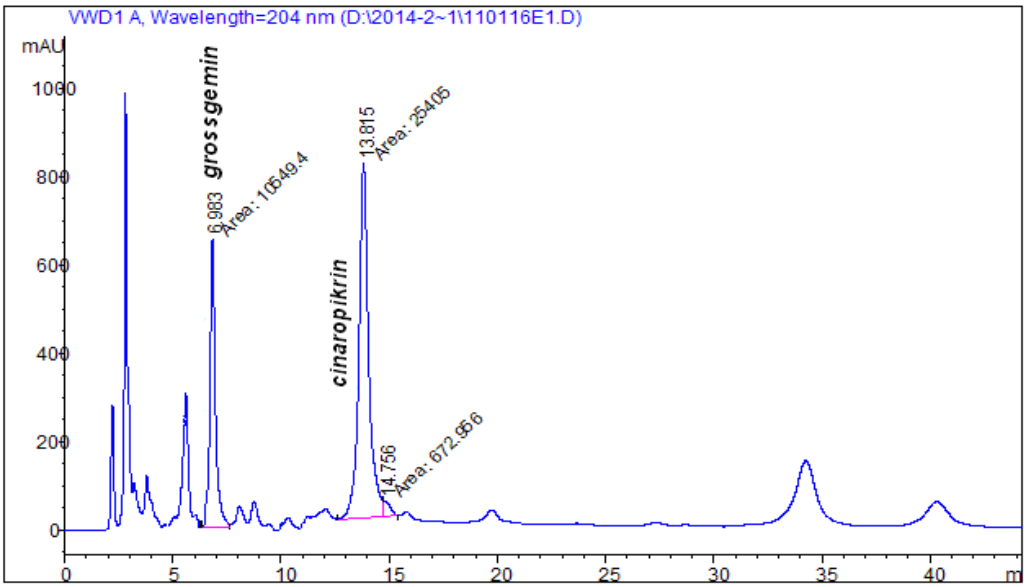


Рисунок 5 - Хроматограмма количественного определения гроссгемина и цинаропикрина в сырье хартолеписа среднего

По валидационным характеристикам методика является специфичной для определения содержания гроссгемина и цинаропикрина в траве хартолеписа среднего, характеризуется корректной точностью и воспроизводимостью, линейной зависимостью в аналитической области ± 30 % от принятого за 100 %, что позволяет использовать ее для достоверной оценки количественного содержания гроссгемина и цинаропикрина в траве хартолеписа среднего.

Хартолепис средний является перспективным возобновляемым источником биологически активных сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и цинаропикрина. По результатам обследования сырьевых запасов хартолеписа среднего на территории Центрального Казахстана выявлено, что хартолепис средний распространен на большей части Центрально-Казахстанского

мелкосопочника, кроме Кокчетавской возвышенности, установлены основные районы произрастания (окр. поселка Сарепта Нуринского района, села Березняки Бухар-Жырауского района и по пойме реки Акбастау Абайского района Карагандинской области). Общий эксплуатационный запас сырья хартолеписа среднего в исследуемых сообществах определен в 197,2 ц/га. Возможный объем ежегодной заготовки оценивается в разных сообществах от 7,1 от 24,3 ц/га.

Таким образом, идентификация лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего проведена по совокупности основополагающих факторов: внешних и микроскопических характеристик, качественного и количественного содержания биологически активных веществ, не только гроссгемина, но и цинаропикрина. Полученные результаты включены в проект АНД на лекарственное растительное сырье «Хартолепис средний трава» [123, 124].

3.2 Идентификация лекарственного растительного сырья гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.)

Гармала обыкновенная (*Peganum harmala* L.) – многолетнее растение семейства *Peganaceae* (Engl.) Tiegh. ex Takht. Произрастает, как сорное, в полузасушливых степях Восточной Европы и Центральной Азии, в пустынях, полупустынях, степях, на засоленной почве во всех районах Казахстана, исключая высокогорья. Известно также под названиями могильник, степная рута, сирийская рута, бибика, собачье зелье [125].

Растение 20-60 см высотой с мощным многоглавым корнем до 2-3 м длины, вертикально уходящим в почву к водоносным слоям. Стебли высотой 30-80 см, разветвлённые, голые, зелёные. Листья очерёдные, короткочерешковые, сидячие, глубоко трёх-, пятираздельные, с линейными острыми долями. Цветки жёлтые или белые, крупные, на цветоножках одиночные или до трёх на концах ветвей. Чашечка, остающаяся при плодах, почти до основания пятираздельная, доли её линейные, заострённые, цельные или слегка надрезанные. Венчик из пяти эллиптических лепестков, длиной 1.5 – 2 см. Тычинок 15. Плод - шаровидная, несколько приплюснутая коробочка, диаметром 6 – 10 мм, трёхгнёздная, с перегородками. Семена коричневые или буровато-серые, клиновидные, трёхгранные, длиной 3 – 4 мм, с бугорчатой поверхностью. Цветение в мае - июле, семена созревают в июле - августе. Имеет сильный специфический запах [125].

Существовал нормативный документ (ВАНД РК 42-466-12, РК-ЛС-3№019698), регламентирующий качество лекарственного растительного сырья «Гармала обыкновенная корни», область применения - сырье для получения алкалоида гармина.

Исследование показателей качества гармалы обыкновенной проводились на 5 сериях опытно-промышленной партии, согласно требованиям ГФ РК, на основе ВАНД РК 42-466-12.

Проведено изучение морфологических особенностей и анатомических признаков корней гармалы обыкновенной.

Внешние признаки. Цельное сырье. Корень стержневой, многоглавый, длиной до 20 см, толщиной до 10 см, деревянистый. Кора буровато–коричневого цвета. Излом корней ровный, желтовато-коричневого цвета. Придаточный корень, 1-4 см в длину, 0.5-1.5 см в ширину, перидерма имеет серовато коричневый цвет, легко снимается, наружная древесина 1-2 мм, светло-коричневая, сердцевинная древесина темно-коричневая (рисунок 6).

Рисунок 6 – Корни гармалы обыкновенной

Измельченное сырье. Кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями 8 мм. Цвет корней буровато-коричневого цвета, иногда зеленоватый. Запах своеобразный.

Идентификация. Микроскопию препарата проводят в соответствие с ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

При рассмотрении поперечного среза корня гармалы обыкновенной видна многорядная пробка, за которой следует неоднородная (по размерам сосудов) паренхима коры. Характерно лучистое строение корня. Сердцевинные лучи узкие одно-двухрядные. Корень отличается наличием сердцевины, состоящей из крупных и мелких округлых клеток. Линия камбия четкая. В древесине сосуды лежат одиночно или небольшими группами (рисунок 7).

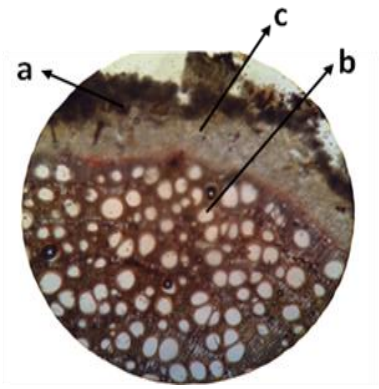


Рисунок 7 - Поперечный срез корня гармалы обыкновенной:
a – пробка, b – паренхима вторичной коры, c – сердцевинные лучи

Диагностические признаки корней гармалы обыкновенной. Лучистое

строение корня, наличие сердцевины, состоящей из крупных и мелких округлых клеток, четкая линия камбия, основная часть корня представлена паренхимными клетками.

Идентификацию сырья подтверждали, исходя из химического состава гармалы обыкновенной, по наличию в нем алкалоидов.

Качественное определение алкалоида гармина проводят методом тонкослойной хроматографии (ГФ РК, т. 1, *2.2.27*).

5.0 г измельченного в порошок сырья (*2.9.12*) помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 96 % этанола Р, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при температуре 50–60 °С в течение 10 мин, охлаждают. Полученный экстракт фильтруют через ватный тампон. Экстракцию повторяют три раза. Объединенные извлечения упаривают в вакууме до густого остатка, растворяют в 20 мл 96 % этанола Р , прибавляют 10 мл воды Р, предварительно нагретой до температуры 70 °С, перемешивают и фильтруют (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки «Silufol» или «Сорбфил» размером 5 х 15 см наносят в виде полосок по 10 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения. Пластинку помещают в камеру с системой растворителей хлороформ - 96 % этанол (6:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе, обрабатывают раствором калия йодовисмута, сушат на воздухе и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. 10.0 мг гармина (СО) растворяют в 10 мл 96 % этанола.

К 10 мл испытуемого раствора, прибавляют 10 мл 96 % этанола, прибавляют 1 мл 1 % раствора кремневольфрамовой кислоты, появляется беловатый осадок (алкалоиды).

Проведен товароведческий анализ пяти серий корней гармалы обыкновенной по следующим показателям.

Посторонние примеси. Не более 2 % (ГФ РК I, т. 1, *2.8.2*).

Потеря в массе при высушивании. Не более 13 % (ГФ РК I, т. 1, *2.2.32*). 1.000 г измельченного сырья (*2.9.12*), сушат при температуре 100-105 ^{0}С в течение 2 ч.

Общая зола. Не более 12 % (ГФ РК I, т. 1, *2.4.16*).

Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной. Не более 3,5 % (ГФ РК I, т. 1, *2.8.1*).

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

Сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, *5.1.4*, категория *4 В*.

Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (*2.6.12*) не более 10^5 бактерий и не более 10^4 грибов в 1.0 г.

Не более 10^3 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных

бактерий в 1.0 г.

В 1.0 г сырья не допускается наличие *Escherichia coli* и *Salmonella* в 10.0 г.

Радионуклиды. Сырье должно соответствовать требованию СанПиН №4.01.071.03.

Результаты товароведческого анализа корней гармалы обыкновенной травы хартолеписа среднего приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты товароведческого анализа корней гармалы обыкновенной

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота	Радионуклиды
011013	1,10	10,4	7,85	3,85	соответствует	соответствует
021013	1,03	10,5	7,81	3,87	соответствует	соответствует
031013	1,01	10,1	7,83	3,83	соответствует	соответствует
041013	1,02	10,6	7,87	3,86	соответствует	соответствует
051013	1,04	10,3	7,84	3,84	соответствует	соответствует

Количественное определение. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, *2.2.29*). Около 1 г (точная навеска) измельченного в порошок сырья гармалы обыкновенной и 30 мл 96 % этанола помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин., охлаждают и фильтруют. Экстракцию поводят дважды, каждый раз прибавляя к сырью по 30 мл 96 % этанола. Объединенные спиртовые извлечения упаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в подвижной фазе, затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

5.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазы до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм (испытуемый раствор).

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

– колонка размером 4,6х150 мм, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18, с размером частиц 5 мкм;

– подвижная фаза: ацетонитрил–0.1 М водный раствор аммиака (1:1), дегазированная любым способом;

– детектирование при длине волн 301 нм;

– скорость подвижной фазы – 0,25 мл/мин;

– температура колонки – комнатная.

Содержание гармина (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100-W)} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot (100-W)}:$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков гармина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков гармина, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения;

m_0 – масса навески СО гармина, в граммах;

m_1 – масса навески сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Приготовление раствора сравнения. 2.0 мг гармина (СО ГФ РК), помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм.

Проверка пригодности хроматографической системы: Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику достоверного образца гармина на хроматограмме достоверного образца гармина, должна составлять не менее 4000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика гармина на хроматограмме раствора сравнения, должна быть не более 2 %;
- коэффициент ассиметрии пика, рассчитанный для пика стандартного образца гармина на хроматограмме стандартного образца гармина должен быть не более 2.

Содержание гармина в сухом сырье должно быть не менее 0.5 %.

На рисунке 8 представлена хроматограмма количественного определения гармина в корнях гармалы обыкновенной.

По валидационным характеристикам методика является специфичной для определения содержания гармина в корнях гармалы обыкновенной, характеризуется корректной точностью и воспроизводимостью, линейной зависимостью в аналитической области ± 30 % от принятого за 100 %, что позволяет использовать ее для достоверной оценки количественного содержания гармина в корнях гармалы обыкновенной.

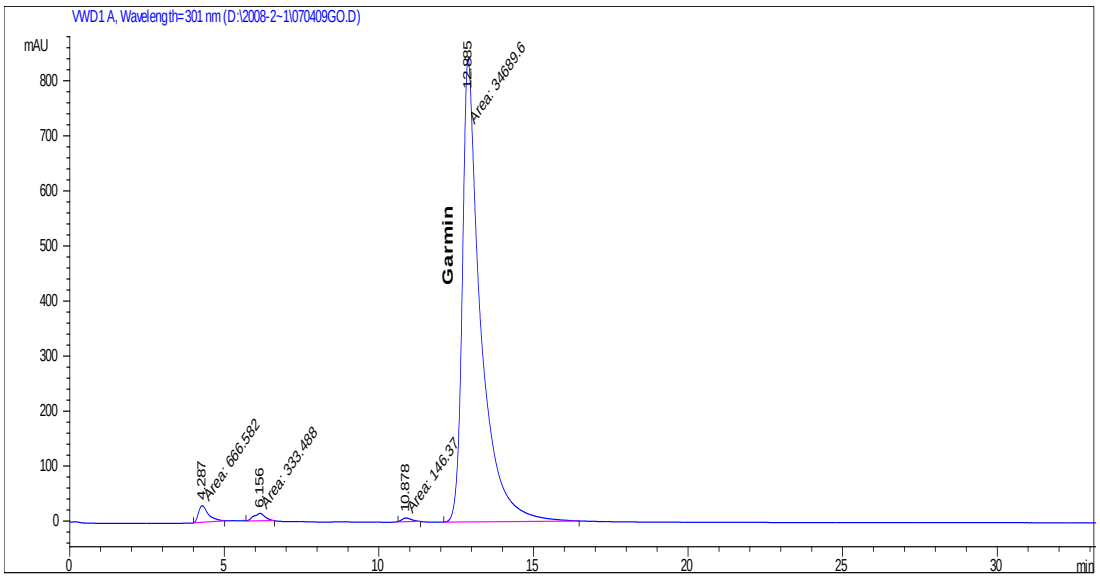


Рисунок 8 - Хроматограмма количественного определения гармина в корнях гармалы обыкновенной

Гармала обыкновенная является перспективным возобновляемым источником биологически активного индольного алкалоида гармина. В результате обследования сырьевых запасов гармалы обыкновенной на территории Курдайского горного массива Жамбылской области, Ордабасынского района Южно-Казахстанской области и Жанакорганского района Кызыл-Ординской области в июне-июле 2010 года выявлено распространение и запасы сырья гармалы обыкновенной. Промысловые заросли гармалы обыкновенной были выявлены на территории Ордабасынского района в 1.5 км северо-западнее от пос. Жамбыл, где эксплуатационный запас равен 18.6 т сухого сырья, с обьемом ежегодных заготовок не более 6.2 т сухого сырья и в 3 км юго-восточнее от пос. Кольтоган, около пос. Берген Исаханова, эксплуатационным запасом 13.5 т с обьемом ежегодных заготовок не более 4.5 т сухого сырья. Второй промысловые заросли гармалы обыкновенной были выявлены на территории Жанакорганского района в 1 км севернее от станции Бесарык, вокруг станции Талап и в 3 км севернее от пос. Акуйик, в среднем эксплуатационный запас составляет 8.0 т с обьемом ежегодных заготовок не более 2.2 т сухого сырья.

Таким образом, по совокупности внешних и микроскопических характеристик, качественного и количественного содержания биологически активного вещества гармина проведена идентификация лекарственного растительного сырья гармалы обыкновенной. Полученные данные включены в проект АНД на лекарственное растительное сырье «Гармала обыкновенная корни» [123].

4 ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРОССГЕМИНА, ЦИНАРОПИКРИНА И ГАРМИНА

4.1 Разработка нового способа выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина

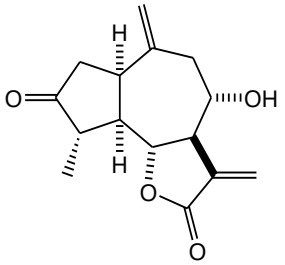
В плане разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых оригинальных высокоэффективных фитопрепаратов перспективным объектом является хартолепис средний - возобновляемый источник биологически активных сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и цинаропикрина [126].

Гроссгемин (7**1**) – сесквитерпеновый лактон гвайанового типа, обладающий высокой противоопухолевой, антивирусной, противовоспалительной, бактерицидной активностью [127-129], является субстанцией для производства лекарственного средства «Хартинол» и основной родственной примесью для контроля качества субстанции «Хартинол» и готовой лекарственной формы данного средства.

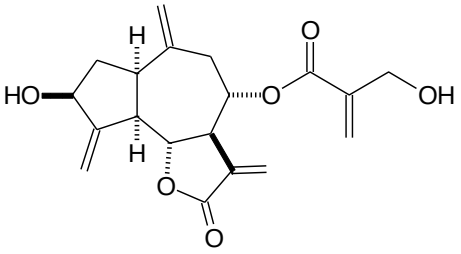
Лекарственное средство «Хартинол» представляет собой водорастворимую форму гроссгемина, полученную путем химической модификации, исследования антивирусного свойства которой, показали перспективность в качестве нового антивирусного средства для борьбы с гриппозной инфекцией и позволяют рекомендовать данное лекарственное средство для расширенных доклинических и клинических испытаний [130].

Поэтому гроссгемин необходим в качестве собственного стандартного образца Республики Казахстан для поэтапного контроля качества фармацевтического производства противовирусного лекарственного средства «Хартинол»: контроль на входе – контроль качества сырья хартолеписа среднего, промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции гроссгемина и контроль на выходе, то есть, качество субстанции гроссгемина. Так же стандартный образец гроссгемина применяется в качестве основной родственной примеси для контроля качества субстанции «Хартинол» и готовой лекарственной формы данного средства.

Цинаропикрин (**72**) – сесквитерпеновый лактон гвайанового типа, который обладает высокой противоопухолевой, бактерицидной, протистоцидной, при кишечных инфекциях (жирардиозе или лямблиозе), противотрихомонадной активностью, является действующим веществом противопаразитарного средства «Саусалин» [131, 132].



(**71**)



(**72**)

Цинаропикрин необходим в качестве собственного стандартного образца Республики Казахстан для поэтапного контроля качества фармацевтического производства противопаразитарного лекарственного средства «Саусалин»: контроль на входе – контроль качества сырья *Saussureae salsae* Pall., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции - сухого экстракта *Saussureae salsae* Pall., и контроль на выходе - качество таблеток «Саусалин». А также для оценки качества лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего.

Как было отмечено в литературном обзоре, основным способом выделения и очистки биологически активных сесквитерпеновых лактонов является колоночная хроматография - достаточно долгий, трудоемкий, многостадийный процесс, требующий использования большого количества дорогостоящих, зачастую, токсичных органических растворителей.

Ранее для наработки гроссгемина и цинаропикрина применялись следующие способы:

− водная экстракция листьев гроссгемии крупноголовой (*Grossheimia macrocephala* (Muss.-Puschk. ex Willd.) Sosn. et Takht.), с последующей обработкой экстракта хлороформом; далее сумму экстрактивных веществ растирают с небольшим количеством спирта, к спиртовому раствору прибавляют эфир до помутнения, выпавшие кристаллы гроссгемина промывают эфиром и перекристаллизовывают из спирта, выход составляет 0,05 % в пересчете на воздушно-сухое сырье, при этом цинаропикрин не выделяли [133].

− ацетоновая экстракция листьев гроссгемии крупноголовой (*Grossheimia macrocephala* (Muss.-Puschk. ex Willd.) Sosn. et Takht.), с последующей обработкой экстракта гексаном, водным метанолом и реэкстракцией хлороформом; далее проводится колоночная хроматография суммы экстрактивных веществ на силикагеле, элюенты: хлороформ→смесь хлороформ:метанол (80:20), выход гроссгемина составляет 0,13 %, выход цинаропикрина 0,09 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [134].

− хлорофорная экстракция цветочных корзинок, листьев хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), с последующей обработкой экстракта водным этанолом и реэкстракцией хлороформом; затем колоночная хроматография суммы экстрактивных веществ на силикагеле, элюент смесь петролейный эфир:этилацетат (75:25), выход гроссгемина составляет 0,05 %, выход цинаропикрина 0,10 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [126].

− этилацетатная экстракция цветочных корзинок, листьев хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), с последующей обработкой экстракта водным этанолом и реэкстракцией этилацетатом; затем колоночная хроматография суммы экстрактивных веществ на силикагеле, элюент смесь петролейный эфир:этилацетат (75:25), выход гроссгемина составляет 0,11 %, выход цинаропикрина 0,22 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [135].

− этилацетатная экстракция цветочных корзинок, листьев хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.); с последующим разделением суммы экстрактивных веществ с применением центробежной хроматографии

распределения, с использованием смеси растворителей гептан: этилацетат:ацетонитрил:вода (1:2:2:2), выход гроссгемина составляет 0,14 % в пересчете на воздушно-сухое сырье, при этом цинаропикрин не выделяли [136].

Как видно из вышеизложенного, способы выделения и очистки биологически активных веществ гроссгемина и цинаропикрина характеризуются многостадийностью, использованием дорогостоящих, легковоспламеняющихся, токсичных органических растворителей (хлороформ, бензол, петролейный эфир, ацетон и др.), либо проводится наработка гроссгемина с применением центробежной хроматографии распределения, а выделение цинаропикрина не осуществляется.

Поэтому разработка нового способа выделения и очистки биологически активных веществ гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением современных хроматографических методов является важной и приоритетной задачей.

Для разработки нового способа выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего была применена центробежная хроматография распределения.

Поскольку основой успешного разделения с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) является правильный выбор хроматографической системы растворителей, работу необходимо начинать с подбора оптимальной системы растворителей, которая обеспечит количественные выходы качественных целевых продуктов.

Поэтому изначально был проведен подбор системы растворителей для разделения на установке FCPC-A200 этилацетатного экстракта хартолеписа среднего, при этом использовались следующие смеси растворителей:

1) гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1);
2) гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:2:1:2);
3) гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:3:1:3).

Двухфазная система для разделения этилацетатного экстракта хартолеписа среднего подобрана согласно коэффициенту распределения (K) гроссгемина (**71**) и цинаропикрина (**72**), между двумя не смешивающимися фазами, значение К гроссгемина и цинаропикрина оценивали по анализу методом ТСХ. Оптимальной системой растворителей для выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего определена смесь гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1), в качестве подвижной фазы будет использован нижний слой системы, в качестве стационарной фазы – верхний слой системы.

Проведено разделения этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с на установке FCPC-A200.

Разделение № 1 в следующих условиях: ротор 250 мл, система растворителей гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1), проба - 2,3 г экстракта растворили в 15 мл верхней (стационарной) фазы и 10 мл подвижной фазы, 10 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование при 220, 254, 360, 460 нм, скорость вращения ротора 1400 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия:

- элюирование – нисходящий метод (подача элюента сверху вниз), подвижная фаза – нижний слой (полярный), скорость подачи элюента 2,5 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин., наработано 64 фракции;

- экструзия - нисходящий метод (подача элюента сверху вниз), подвижная фаза – верхний слой (неполярный), скорость подачи элюента 2,5 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин., наработано 14 фракций.

Фракции упарили на роторном испарителе и провели анализ методом ВЭЖХ. В результате установлено, что фракции 43-53 включают от 15,85 до 48,33 % гроссгемина (рисунок 9) со значительным содержанием сопутствующих веществ. При экструзии получены фракции 8-10, фракция 8 включает в себя 10,07 % гроссгемина и 81,19 % цинаропикрина (рисунок 10), фракция 10 - 17,47 % гроссгемина и 71,83 % цинаропикрина (рисунок 11).

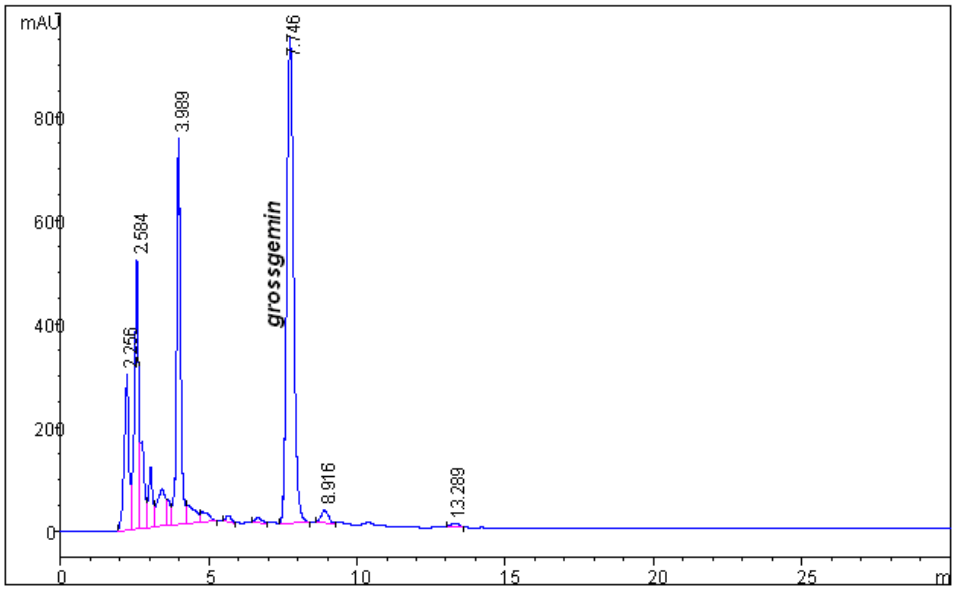


Рисунок 9 - Хроматограмма фракции 49 с содержанием гроссгемина 48,33 %

Разделение № 2 в следующих условиях: ротор 250 мл, система растворителей гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1), проба - 2,3 г экстракта растворили в 15 мл верхней (стационарной) фазы и 10 мл подвижной фазы, 10 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование при 220, 254, 360, 460 нм, скорость вращения ротора 1400 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия:

- элюирование – восходящий метод (подача элюента снизу вверх), подвижная фаза – верхний слой (неполярный), скорость подачи элюента 2,5 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин., наработано 62 фракции;

- экструзия - восходящий метод (подача элюента снизу вверх), подвижная фаза – нижний слой (полярный), скорость подачи элюента 2,5 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин, наработано 17 фракций.

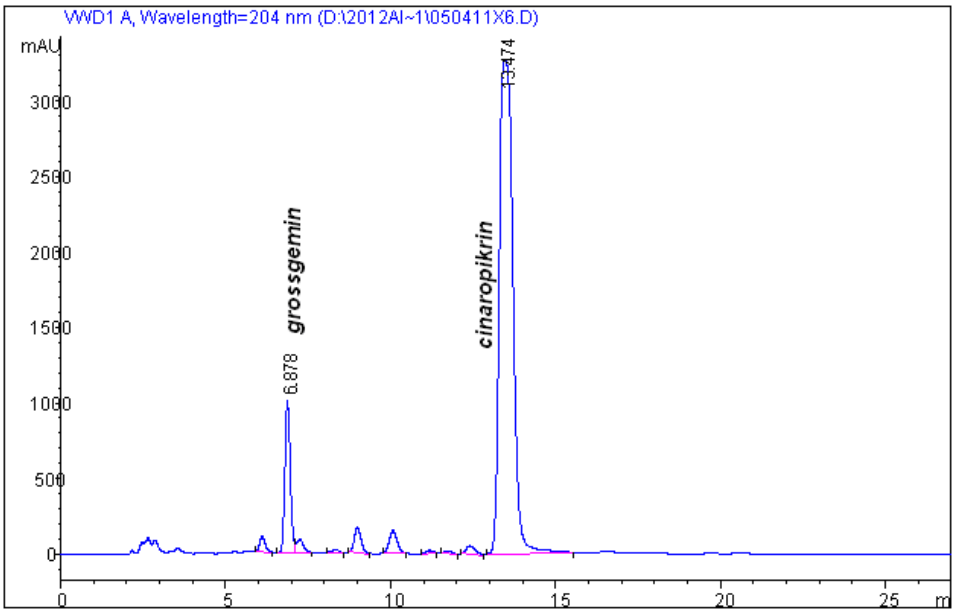


Рисунок 10 - Хроматограмма фракции 8 с содержанием 10,07 % гроссгемина и 81,19 % цинаропикрина

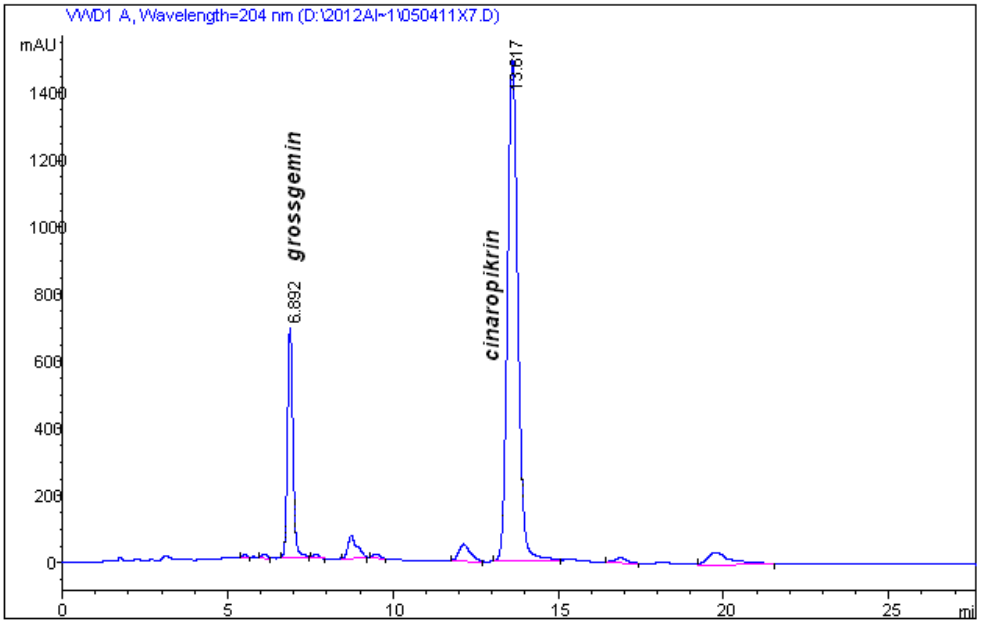


Рисунок 11 - Хроматограмма фракции 10 с содержанием 17,47 % гроссгемина и 71,83 % цинаропикрина

Фракции упарили на роторном испарителе и провели анализ методом ВЭЖХ. Получены фракции 20-30: фракция 20 содержит 16,13 % гроссгемина и 62,85 % цинаропикрина (рисунок 12), фракция 22 включает в себя 22,23 % гроссгемина и 68,34 % цинаропикрина (рисунок 13), фракция 24 с содержанием 18,59 % гроссгемина и 78,21 % цинаропикрина (рисунок 14), фракция 30 содержит 6,25 % гроссгемина и 77,34 % цинаропикрина (рисунок 15), которые были объединены. В результате получена суммарная фракция, включающая 17

% гроссгемина и 72 % цинаропикрина, с минимальным содержанием сопутствующих веществ.

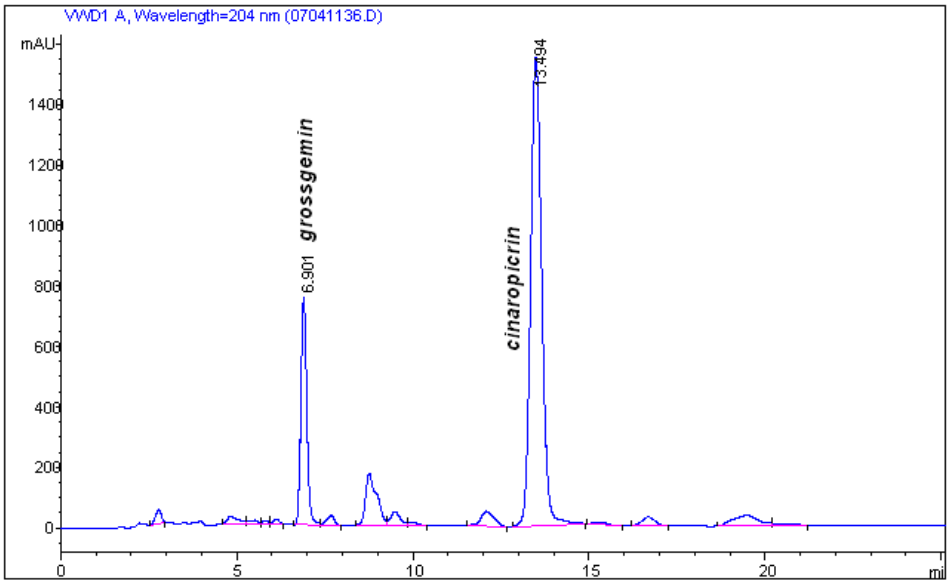


Рисунок 12 - Хроматограмма фракции 20 с содержанием 16,13 % гроссгемина и 62,85 % цинаропикрина

Поскольку при разделении этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения не удалось выделить гроссгемин и цинаропикрин индивидуально, но при разделении № 2 была получена суммарная фракция, включающая 17 % гроссгемина и 72 % цинаропикрина, с минимальным содержанием сопутствующих веществ, поэтому далее для очистки целевых продуктов использовали препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию.

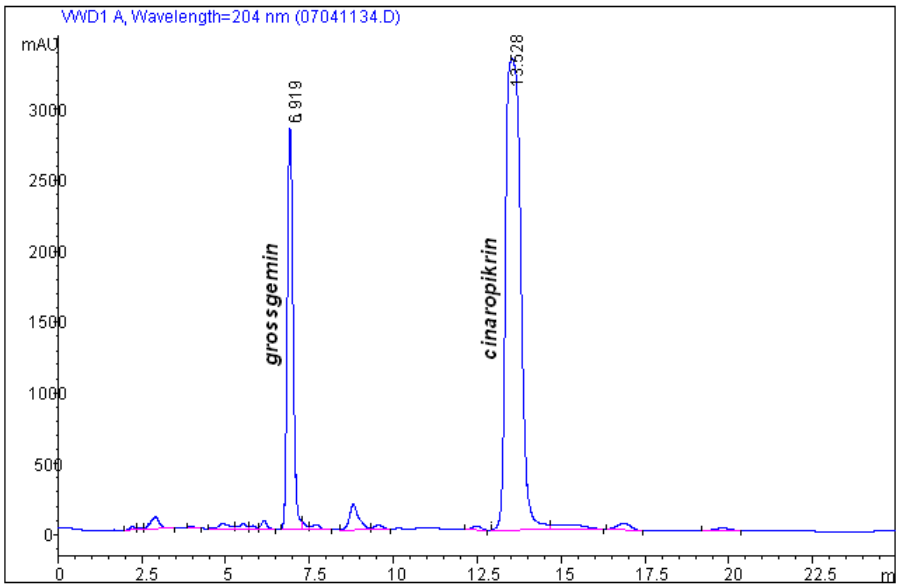


Рисунок 13 - Хроматограмма фракции 22 с содержанием 22,23 % гроссгемина и 68,34 % цинаропикрина

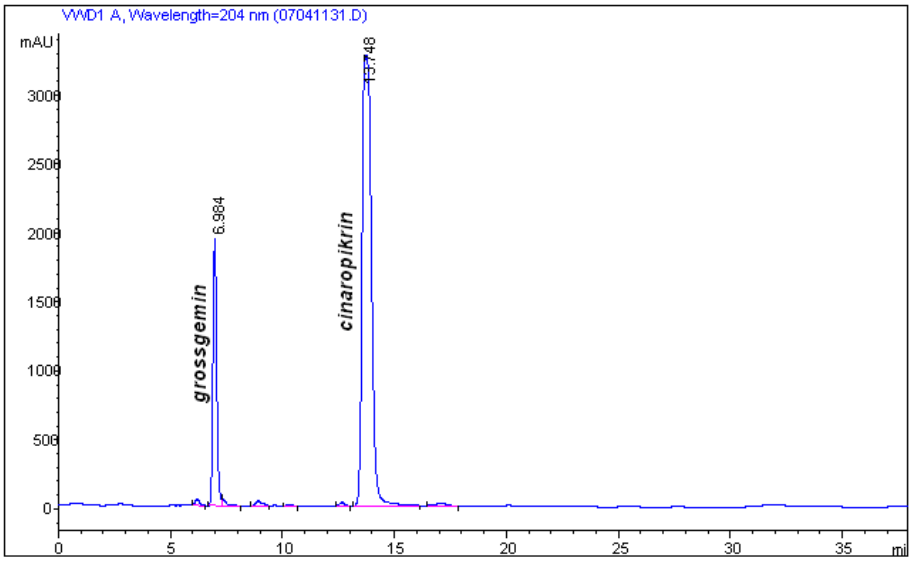


Рисунок 14 – Хроматограмма фракции 24 с содержанием 18,59 % гроссгемина и 78,21 % цинаропикрина

Разделение суммарной фракции, содержащей 17 % гроссгемина и 72 % цинаропикрина, проводили на препаративной установке HPLC с применением обращенно-фазового варианта ВЭЖХ с использованием полупрепаративной колонки 9,1x250 мм, заполненной сорбентом RP-18 с размером частиц 10 μм, состав подвижной фазы: смесь ацетонитрил-вода (50:50). При объемной скорости подачи элюента 4 мл в минуту полное разделение пробы происходит в течение 30 минут, температура колонки комнатная. УФ-детектирование при 204 нм.

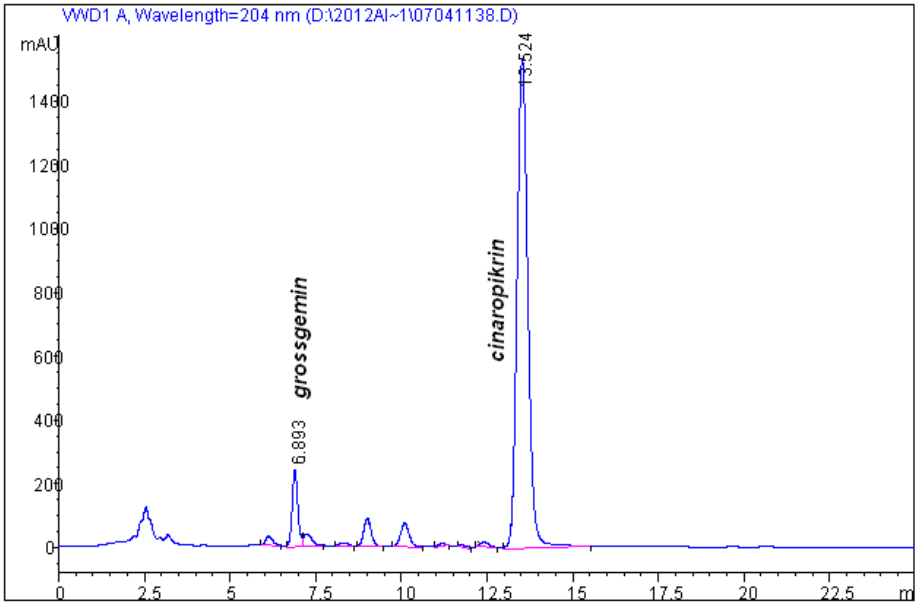


Рисунок 15 – Хроматограмма фракции 30 с содержанием 6,25 % гроссгемина и 77,34 % цинаропикрина

В результате наработаны фракции, содержащие целевые продукты, после упаривания растворителя получены гроссгемин с чистотой 99,39 % и

цинаропикрин с чистотой 98,74 %. Выход гроссгемина составил 6,5 %, в пересчете на массу экстракта (0,14 % в пересчете на воздушно-сухое сырье), а выход цинаропикрина – 24,7 %, в пересчете на массу экстракта (0,49 % в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Экспериментально установлено, что оптимальным способом для выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего, обеспечивающим количественный выход качественных целевых продуктов, является комбинация центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таким образом, разработан новый способ выделения и очистки гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии [135, 136].

4.2 Разработка технологии получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина

Для обеспечения стабильной наработки необходимого количества СО соответствующего качества, на основе нового способа, разработана технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из сухого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина включает в себя два этапа:

Первый этап: разделение сухого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего на препаративной установке FCPC-5000.

Хроматографирование проводят в следующих условиях: ротор 5000 мл, система растворителей гептан:этилацетат:ацетонитрил:вода (1:1:1:1), проба - 50,0 г экстракта растворили в 150 мл стационарной фазы и 200 мл подвижной фазы, 350 мл пробы вводят в хроматограф, при скорости подачи мобильной фазы 30 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 об/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 1,5 часов. УФ-детектирование при 220 нм. Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, согласно получаемой хроматограмме. В результате разделения получают 8 фракций объемом от 100 до 300 мл.

После упаривания растворителя получена фракция № 4, содержащая 17 % гроссгемина и 72 % цинаропикрина, массой 17,53 г.

Второй этап: выделение гроссгемина и цинаропикрина на препаративной установке HPLC.

Разделение фракции № 4, содержащей 17 % гроссгемина и 72 % цинаропикрина, проводится на колонке 100x250 мм, заполненной сорбентом «Microsorb 60-8 C18» (10 мкм) при скорости подачи 250 мл/мин мобильной фазы ацетонитрил-вода (1:1), полное разделение вводимой пробы происходит в

течение 30 мин. УФ-детектирование при 220 нм. Сбор фракций осуществляют согласно получаемой хроматограмме.

В результате разделения получены фракции, содержащие целевые продукты в индивидуальном виде. После упаривания растворителя и перекристаллизации гроссгемина, получены 3,25 г гроссгемина с чистотой 99,39 % и 12,35 г цинаропикрина с чистотой 98,74 %. Выход гроссгемина составил 6,5 %, а выход цинаропикрина – 24,7 %, в пересчете на массу экстракта.

Сравнение основных показателей технологий выделения гроссгемина и цинаропикрина с использованием колоночной хроматографии (КХ) и с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) + высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Сравнение основных показателей технологий выделения гроссгемина и цинаропикрина с использованием колоночной хроматографии (КХ) и с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) + высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Показатели	КХ	ЦХР+ВЭЖХ	Эффективность
Временные затраты	20 рабочих дней	20 рабочих дней	-
Производительность технологического процесса получения гроссгемина цинаропикрина	20 г 76 г	57,5 г 220 г	Увеличена в 2,9 раз
Выход продукта (в пересчете на массу экстракта) гроссгемин цинаропикрин	5,0 % 19,0 %	6,5 % 24,7 %	Увеличен в 1,3 раза
Сорбент	Силикагель марки КСК – 1,6 кг (используется однократно)	Сорбент марки Microsorb 60-8 C18 – 1,5 кг (используется многократно)	Сорбент марки Microsorb 60-8 C18 – 1,5 кг (используется многократно)
Расход растворителей	Петролейный эфир-24,8 кг, Этилацетат – 4,5 кг Этанол – 1,6 кг	Гептан – 6,4 кг, ацетонитрил – 14,8 кг, этилацетат – 8,8 кг, дистиллированная вода - 20 кг	Исключены токсичные растворители

Как видно из таблицы 4, за счет сравнительной автоматизации и уменьшения продолжительности, удалось повысить производительность технологического процесса получения гроссгемина и цинаропикрина в 2,9 раза, также исключено использование токсичных растворителей. Эффективность

разработанной технологии, при снижении трудозатрат в 2,0 раза, позволила снизить себестоимость целевых продуктов в 3 раза.

Таким образом, разработана новая технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из сухого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая обеспечивает стабильную наработку необходимого количества целевых продуктов соответствующего качества.

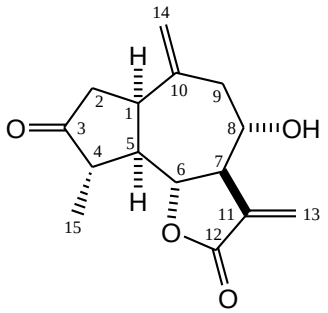
4.3 Идентификация и оценка качества стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина

4.3.1 Идентификация стандартного образца гроссгемина

Для включения гроссгемина, в качестве национального стандартного образца в Государственную фармакопею Республики Казахстан, необходимо выполнить исследования по описанию вещества визуальными методами, определению структурной формулы с использованием ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа.

Гроссгемин [3-оксо-8-гидрокси-1,5,7α,4,8β(H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12,6-олид] относится к сесквитерпеновым лактонам гвайанового типа.

Гроссгемин (**71**) - кристаллический порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха, температура от 200 °С до 203°С (этанол), растворим в 96 % этаноле, легко растворим в этилацетате, хлороформе, практически не растворим в воде, представленные данные сопоставимы с литературными [139-141].



(**71**)

В ИК-спектре гроссгемина присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для групп 3474 (ОН-группа), 1741 (С=О γ-лактона), 1648 (С=С), 1399, 1167 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилом γ-лактона) 977, 921, 822, 685, 562, 482 см$^{-1}$. Представленные данные сопоставимы с литературными [139-141].

В УФ-спектре гроссгемина имеет максимум поглощения при длине волны 201±2 нм, типичный для экзоциклического метилена, находящегося в сопряжении с карбонилом. Представленные данные сопоставимы с литературными [139, 140].

В масс-спектре гроссгемина присутствует пик молекулярного иона с небольшой интенсивностью m/z 262 [M^+], что соответствует его молекулярной массе. Далее распад этого иона происходит по двум направлениям. Ион с m/z 244 образуется за счет элиминирования молекулы воды, что свидетельствует о наличии в исходном гвайанолиде гидроксильной группы. Потеря этим фрагментом группы CO приводит к возникновению иона с m/z 216. Фрагментация молекулярного иона по второму пути начинается с выброса группы CO (пик с m/z 234) и последующей потерей молекулы воды (пик с m/z 216). Ион с m/z 200 образуется за счет элиминирования молекулы воды, что подтверждает наличие в молекуле гроссгемина кето-группы.

Схема фрагментации гроссгемина по масс-спектру представлена на рисунке 16. Представленные данные сопоставимы с литературными [139, 140].

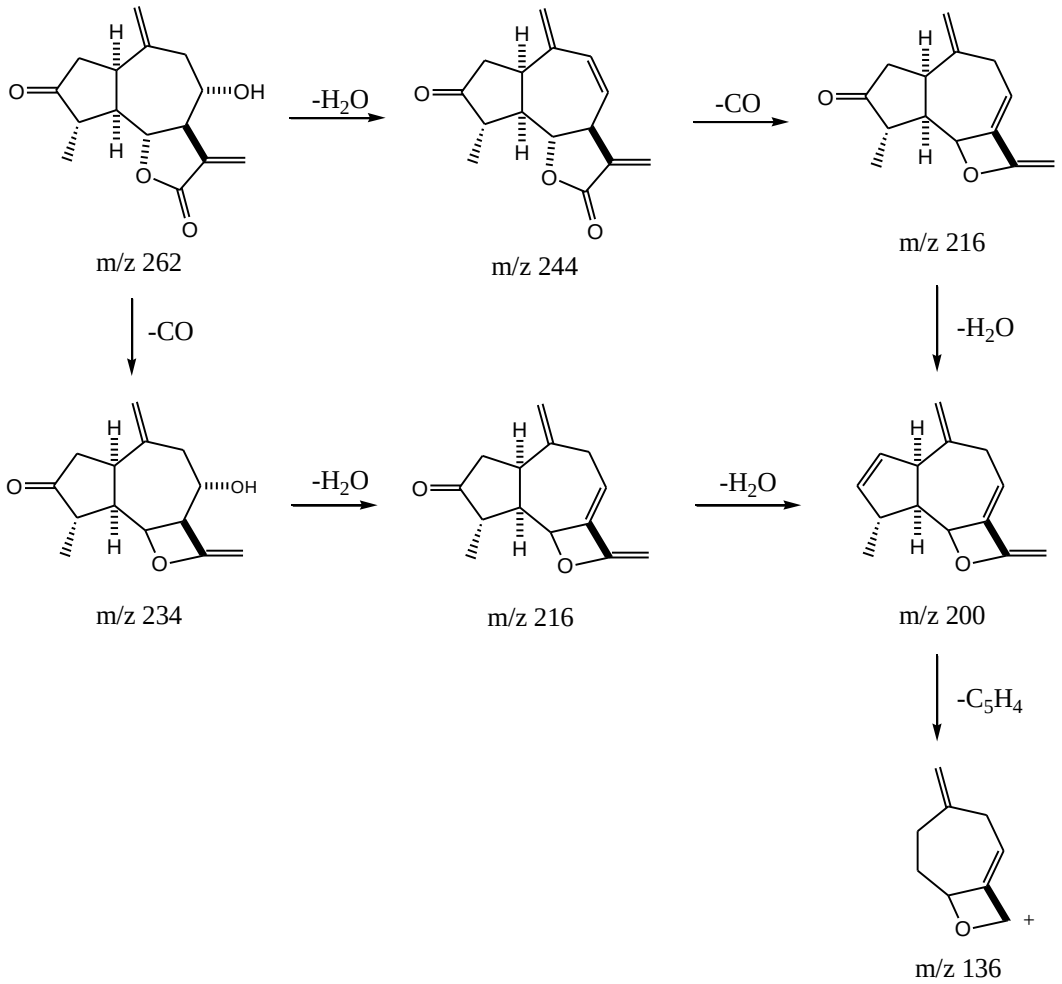


Рисунок 16 - Схема фрагментации гроссгемина по масс-спектру

Элементный анализ гроссгемина: найдено %: C 68.80; H 6.89; вычислено %: C 68.70; H 6.87.

Спектр ПМР (500.13 МГц, $CD_3OD+CDCl_3$, δ,м.д., J/Гц): 3.25 м (H-1), 2.53 дд (J_1=4 ,J_2=6, H-2а), 2.64 д (J=9, H-2б), 2.59 д (J=9.0, H-4), 2.45 м (H-5), 4.08 т (J=9.0, H-6), 3.15 м (H-7), 3.82 м (H-8), 2.28 м (H-9а), 2.37 м (H-9б), 6.29 дд (J_1=3, J_2=4, H-13а), 6.36 дд (J_1=3, J_2=4, H-13б), 4.8 с (H-14а), 5.1 с (H-14б), 1.25 д (J=4, 3H-15).

В спектре ПМР молекулы гроссгемина наблюдаются сигналы протонов метила при С-4 - дублет при 1.25 м.д., протона Н-5 – мультиплет при 2.45 м.д., два симметричных дублета дублетов при 6.29 м.д. с КССВ J_1=3, J_2=4 Гц и 6,36 м.д. с КССВ J_1=3, J_2=4 Гц, принадлежащие экзометиленовой метильной группе при С-13, мультиплет метинового протона Н-7 с центром при 3.15 м.д., а также триплет лактонного протона Н-6 при 4,08 м.д. с КССВ 9.0 Гц. Характер расщепления сигнала лактонного протона указывает на то, что у гроссгемина лактонное кольцо расположено при С6-С7 основного скелета, а константа спин-спинового взаимодействия – на его транс-сочленение. Данные ПМР-спектра сопоставимы с литературными [139-141].

Спектр ЯМР ^{13}С (125.76 МГц, $CD_3OD+CDCl_3$): 40.98 (д, С-1), 43.97 (т, С-2), 221.6 (с, С-3), 47.91 (д, С-4), 51.83 (д, С-5), 84.25 (д, С-6), 49.98 (д, С-7), 73.67 (д, С-8), 49.14 (т, С-9), 145.26 (с, С-10), 138.35 (с, С-11), 171.82 (с, С-12), 125.54 (т, С-13), 115.26 (т, С-14), 15.06 (к, С-15).

В спектре ЯМР ^{13}С гроссгемина присутствуют 4 синглетных, 6 дублетных, 4 триплетных и 1 квартетный сигналы, характерные для 6 sp^2- и 9 sp^3-гибридизованных углеродных атомов. Данные ПМР-спектра сопоставимы с литературными [139-141].

Пространственное строение молекулы гроссгемина установлено по данным рентгеноструктурного анализа (рисунок 17).

Кристаллические данные для гроссгемина**:** $C_{15}H_{18}0_4$, моноклинный, пр.гр. $P2_1$, *a*=8,077(2), *b=7*,438(1), *c*=11,486(2) Å, β=96,43(3)°, $d_{выч}$=1,270 г·см$^{-3}$, *z*=2, F(0OO)=28O. 1965 независимых отражений измерены на дифрактомере «Siemens P3» (графитовый монохроматор, MoKα-излучение, 0/20-сканирование) [142].

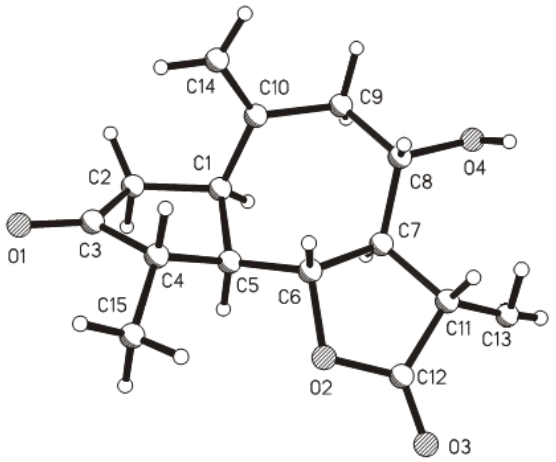


Рисунок 17 - Пространственное строение молекулы гроссгемина по данным рентгеноструктурного анализа

Информация об уровне опасности (взрывоопасность, пожароопасность, токсикологические свойства) гроссгемина - не взрывоопасен, не пожароопасен, относится к умеренно токсичному классу веществ.

По результатам изучения острой токсичности водорастворимой формы гроссгемина (метилйодида диметиламиногроссгемина) было установлено, что данное соединение относится к умеренно токсичному классу веществ.

Водорастворимая форма гроссгемина при однократном интраназальном введении в дозе 50 мг/кг в течение суток при хроническом применении не проявляет эмбриотоксических, тератогенных свойств регистрируемых в антенатальном и постнатальном периодах развития и не влияет на репродуктивную функцию животных.

Водорастворимая форма гроссгемина в хроническом эксперименте в дозах 10 мг/кг и 50 мг/кг при его интраназальном введении на функции и морфологическое состояние основных органов и систем организма не повлиял [143].

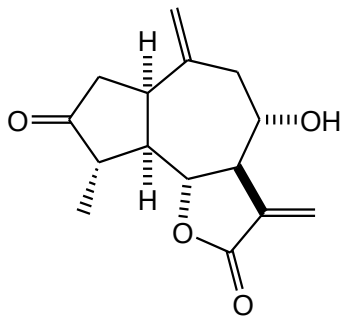
Таким образом, строение стандартного образца гроссгемина однозначно доказана на основании ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа. Описаны физико-химические и спектральные показатели стандартного образца гроссгемина, которые будут использованы для идентификации и количественного определения гроссгемина в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

4.3.2 Спецификация качества стандартного образца гроссгемина

Поскольку необходим нормативный документ, регламентирующий качество стандартного образца гроссгемина, разработан проект АНД, который составлен на сновании результатов анализов 3 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК (таблица 5).

Спецификация качества включает в себя следующие показатели:

Определение: Гроссгемин содержит не менее 98.0 % [3-оксо-8-гидрокси-1,5,7α,4,8β(H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12,6-олида].



$C_{15}H_{18}O_4$ M_r 262

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

Таблица 5 - Спецификация качества стандартного образца гроссгемина

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Кристаллический порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.	Визуально
Растворимость	Растворим в *96 % этаноле Р*, легко растворим в *этилацетате Р, хлороформе Р*, практически не растворим в *воде Р*.	ГФ РК I, т. 1, *1.4*
Идентификация: - гроссгемин	Инфракрасный спектр поглощения (*2.2.24*) стандартного образца, полученный в дисках с *калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 3800 $см^{-1}$ до 600 $см^{-1}$, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3474 (OH), 1740 (C=O γ -лактона), 1648 (C=C), 1399, 1167 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилом γ-лактона), 977, 921, 822, 685, 562, 482.	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.24*
- гроссгемин	Ультрафиолетовый спектр 0.01 % раствора стандартного образца в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.	УФ-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.25*
- терпеноиды	К 20 мг стандартного образца гроссгемина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной; появляется фиолетовое окрашивание.	В соответствии с АНД
Температура плавления	От 200 до 203 °С.	ГФ РК I, т. 1, *2.2.14*
Вода	Не более 0.5 %	ГФ РК I, т 1, *2.5.12*
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Не более 0.5 %	ГХ, ГФ РК I, т. 1, *2.2.28*
Родственные примеси	Не более 1.0 %.	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, *2.2.29*
Количественное определение	Не менее 98.0 %.	В соответствии с АНД
Хранение	В защищенном от света месте, при температуре от 2 ºС до 8 ºС.	В соответствии с АНД
Срок хранения	1 год	В соответствии с АНД

Свойства:

- *Описание.* Кристаллический порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.

- *Температура плавления*. От 200 °С до 203°С.

- *Растворимость*. Растворим в *96 % этаноле Р*, легко растворим в *этилацетате Р, хлороформе Р*, практически не растворим в *воде Р*.

Идентификация:

А. Инфракрасный спектр поглощения (*2.2.24*) стандартного образца, полученный в дисках с *калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 3800 $см^{-1}$ до 600 $см^{-1}$, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3474 (OH), 1740 (C=O γ-лактона), 1648 (C=C), 1399, 1167 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилом γ-лактона), 977, 921, 822, 685, 562, 482.

В. Ультрафиолетовый спектр 0.01 % раствора стандартного образца в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

С. *Раствор ванилина в кислоте серной*. 0.1 г *ванилина Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р*. Раствор используют свежеприготовленным.

К 20 мг стандартного образца гроссгемина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной; появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Испытания:

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

Испытуемый раствор. 30.0 мг СО гроссгемина растворяют в 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят той же подвижной фазой до объема 25.0 мл. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Раствор сравнения. 30.0 мг СО гроссгемина и 0.21 мг СО цинаропикрина растворяют 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят той же подвижной фазой 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 х 150 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм (например, Zorbax SB-C18);

– подвижная фаза *метанол – вода (50:50)*;

– скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;

– температура колонки комнатная;

– детектирование при длине волны 204 нм.

Время хроматографирования 25 мин.

Хроматографируют 20 мкл раствора сравнения.

Время удерживания гроссгемина 6.92 мин. Относительное время удерживания пика примеси цинаропикрина в стандартном образце около 13.53 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– коэффициент разделения пиков примеси цинаропикрина и гроссгемина составляет не менее 2.0;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гроссгемина составляет не менее 3500 теоретических тарелок;

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

– коэффициент симметрии пика гроссгемина 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 гроссгемина на хроматограмме испытуемого раствора.

Не учитывают пики растворителей. Сумма примесей не должна превышать 1.0 %.

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

Раствор внутреннего стандарта. 0.5 мл *пропанола Р* доводят *углерода тетрахлоридом Р* до объема 100.0 мл.

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

Раствор сравнения. По 0.5 мл *этанола Р* и *пропанола Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят *углеродом четыреххлористым Р* 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 х 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана *(5:95)* толщиной 0.25 мм;

– газ-носитель *аргон для хроматографии*, скорость 20 мл /мин;

– скорость водорода 40 мл /мин;

– скорость воздуха 400 мл /мин;

– температура колонки 30 ºС;

– температура детектора 120 ºС;

– температура испарителя 100 ºС.

Хроматографируют 0,2 мкл раствора сравнения.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола составляет не менее 30000 теоретических тарелок;

– коэффициент симметрии пика этанола составляет не более 2 %;

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

Хроматографируют 0,2 мкл испытуемого раствора.

Содержание этанола в стандартном образце 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 этанола на хроматограмме испытуемого раствора;

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

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

S_0 – площадь пика этанола на хроматограмме раствора сравнения;

m – масса навески стандартного образца в миллиграммах;

V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;

p – плотность этанола;

P – содержание этанола в образце этанола в процентах;

З – разведение;

f – фактор пересчета, равный

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

Содержание C_2H_5OH (этанола) в стандартном образце гроссгемина должно быть не более 0,5 %.

Количественное определение. Содержание гроссгемина в стандартном образце гроссгемина (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 гроссгемина.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 ºС до 8 ºС.

Для определения срока хранения стандартного образца гроссгемина нами исследована стабильность 3 серий опытной партии, заложенных на хранение в защищенном от света месте при температуре от 2 ºС до 8 ºС. Стандартный образец гроссгемина хранили по 100 мг во флаконах типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренных пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатых колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконах импортных.

Контроль основных показателей качества проводили сразу после производства опытной партии стандартного образца гроссгемина, затем через каждые 3 месяца в течение всего периода хранения (в соответствии с требованиями ГФ РК и разработанного нами проекта аналитического нормативного документа на стандартный образец гроссгемина).

Показатели качества стандартного образца гроссгемина всех серий соответствовали проекту аналитического нормативного документа «Гроссгемин – стандартный образец» в течение всего периода хранения (таблица 5). По результатам исследования определен срок хранения стандартного образца гроссгемина 1 год.

Для введения гроссгемина 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 гроссгемина;

2 Валидация методики определения родственных примесей;

3 Сведения о лекарственном растительном сырье хартолепис средний трава;

4 Валидация методики количественного определения гроссгемина в траве хартолеписа среднего;

5 Технологическая схема получения гроссгемина;

6 Производственная формула;

7 Валидация технологического процесса получения гроссгемина;

8 Установление строения гроссгемина;

9 Проект АНД. Хартолепис средний трава;

10 Проект АНД. Гроссгемин – стандартный образец.

Таким образом, разработан проект АНД на гроссгемин – стандартный образец (Приложение А). Гроссгемин 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 (Приложение Б) [144, 145].

Таблица 5 - Результаты исследования стабильности стандартного образца гроссгемина

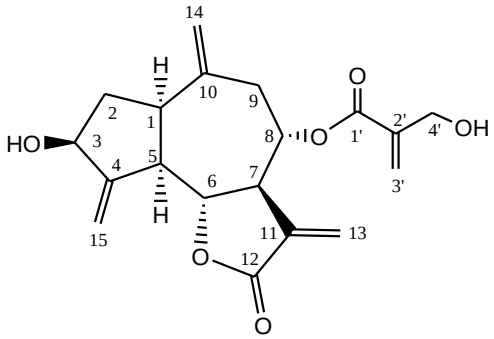
Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Температура плавления	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количествен-ное определение
		Нормы отклонений по проекту АНД							
Серия 040114	06.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,29	0,02	0,24	99,45
	07.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,25	99,43
	07.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	07.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	08.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
Серия 050114	08.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,28	0,02	0,24	99,46
	09.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,29	0,02	0,25	99,44
	09.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	09.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	09.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
Серия 060114	09.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,29	0,02	0,24	99,45
	10.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,25	99,43
	10.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	10.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	12.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43

4.3.3 Идентификация стандартного образца цинаропикрина

Проведены исследования по описанию цинаропикрина визуальными методами, определению структурной формулы с использованием ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и элементного анализа, для включения цинаропикрина, в качестве национального стандартного образца в Государственную фармакопею Республики Казахстан.

Цинаропикрин [3-гидрокси-8-(4’-гидроксиметакроил)-1,5,7α,8β(H)-гвай-4(15),10(14),11(13)-триен-12,6-олид] - сесквитерпеновый лактон гвайанового типа, который получают из растения *Chartolepis intermedia* Boiss. (хартолепис средний), рода *Chartolepis* Cass., семейства *Asteraceae*, собранного в Абайском районе.

Цинаропикрин (**72**) - маслообразное вещество с желтовато-зеленоватым оттенком, без запаха, легко растворим в 96 % этаноле, мало растворим в этилацетате, хлороформе, практически нерастворим в воде представленные данные сопоставимы с литературными [134, 140, 146].



(72)

В ИК-спектре цинаропикрина присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для групп 3428 (OH-группа), 2931, 2872, 1756 (C=O γ-лактона), 1715 (метакриловый эфир), 1660 (C=C), 1376, 1270 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилом γ-лактона), 1151, 1056, 962, 910, 817 см$^{-1}$. Представленные данные сопоставимы с литературными [134, 140, 146].

УФ-спектр цинаропикрина имеет максимум поглощения при длине волны 204±2 нм, типичный для экзоциклического метилена, находящегося в сопряжении с карбонилом.

В масс-спектре цинаропикрина отсутствуют пик молекулярного иона, при этом осколочных ионов зарегистрировано мало, что затрудняет определение структуры молекулы, поскольку цинаропикрин является маслообразным веществом и при температуре выше 80 ºС его молекула подвергается термической деструкции, т.е. разлагается.

Что является закономерным, поскольку, к сожалению, масс-спектрометрия имеет существенный недостаток. Из сферы ее применения, как структурного метода, выпадают термолабильные соединения (в большинстве своем природные соединения), не дающие пика молекулярного иона [M] + в масс-спектрометрии электронного удара. Многие органические вещества

невозможно испарить без разложения, следовательно, их нельзя ионизовать электронным ударом и методом химической ионизации [147].

Элементный анализ цинаропикрина: найдено %: С 66.20; Н 6.64; вычислено %: С 65.90; Н 6.36.

ПМР (600 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д., J/Гц): 3.49 (1Н, м., Н-1 перек. с ОН-3), 2.45 (1Н, м., Н-2а), 2.20 (1Н, м., Н-2б), 3.80 (1Н, уш.д., J=6.0, Н-3), 2.30 (1Н, т, J=10.0, Н-5), 4.79 (1Н, дд., J_1=9.0, J_2=10.0, Н-6), 3.13 (1Н, м., Н-7), 5.13 (Н, м., Н-8), 2.7 (1Н, дд., J_1=4.0, J_2=14.0, Н-9а), 2.39 (1Н, дд., J_1=2.0, J_2=14.0, Н-9б), 6.18 (1Н, д., J=3.0, Н-13а), 5.61 (1Н, д., J=3.0, Н-13б), 5.11 (1Н, с, Н-14а), 4.82 (1Н, с., Н-14б), 4.97 (1Н, д., J=12.0, Н-15а), 5.27 (1Н, д., J=12.0, Н-15б), 6.31 (1Н, с., Н-3´а), 5.93 (1Н, с., Н-3´б), 4.96 (2Н, уш.д., J=4.0, Н-4´), 3.49 (1Н, м, ОН-3 перек. с Н-1), 2.20 (1Н, м, 4´-ОН).

В спектре ПМР цинаропикрина присутствуют синглеты при 6,31 и 5,93 м.д., протонов Н-3´а и Н-3´б экзометиленовой двойной связи остатка 4´-гидроксиметакриловой кислоты; сигналы двух протонов при С-4´ в виде уширенного дублета с КССВ 4,0 Гц при 4.96 м.д. и мультиплет протона 4´-ОН при 2.20 м.д. остатка 4´-гидроксиметакриловой кислоты; дублеты с КССВ 3 Гц при 6,18 и 5,61 м.д., характерные для протонов Н-13а и Н-13б экзометиленовой группы лактонного цикла; синглеты протонов Н-14а, Н-14б при 5,11, 4,82 и дублеты протонов Н-15а, Н-15б с КССВ 12,0 Гц при 5,27 и 4,97 м.д.; мультиплет при 5,13 м.д., указывающий на наличие протона Н-8, геминально расположенном к сложноэфирной группе и дублет дублетов с КССВ J_1=9.0, J_2=10.0 при 4,79 м.д., соответствующий протону лактонного цикла Н-6, мультиплет метинового протона Н-7 с центром при 3.13 м.д. Характер расщепления сигнала лактонного протона указывает на то, что у цинаропикрина лактонное кольцо расположено при С6-С7 основного скелета, а константа спин-спинового взаимодействия – на его транс-сочленение. Также присутствуют сигналы протона Н-1 – мультиплет при 3,49 м.д., мультиплеты при 2,45 м.д. и 2,20 м.д. соответствующие протонам Н-2а и Н-2б, сигналы протона Н-3 в виде дублета при 3,80 м.д. с КССВ J=6,0 Гц, триплета протона Н-5 с КССВ J=10,0 Гц при 2,30 м.д., также дублеты дублетов протонов Н-9а с КССВ J_1=4.0, J_2=14.0 Гц и Н-9б с КССВ J_1=2.0, J_2=14.0 Гц при 2.70 и 2,39 м.д. соответственно, и мультиплет протона ОН-3 при 3,49 м.д. Данные ПМР-спектра сопоставимы с литературными [134, 140, 146, 148].

ЯМР ^{13}С (125,76 МГц, $CDCl_3$): 45.44 (д., С-1), 36.67 (т., С-2), 76.25 (д., С-3), 117.54 (с., С-4), 56.73 (д., С-5), 76.60 (д., С-6), 46.56 (д., С-7), 74.16 (д., С-8), 35.96 (т., С-9), 142.14 (с., С-10), 139.17 (с., С-11), 168.61 (с., С-12), 122.72 (т., С-13), 120.00 (т., С-14), 65.97 (т., С-15), 165.19 (с., С-1´), 136.72 (с., С-2´), 126.60 (т., С-3´), 62.25 (т., С-4´).

В спектре ЯМР ^{13}С цинаропикрина присутствуют 6 синглетных, 6 дублетных, 7 триплетных сигналов. Данные ЯМР-спектра сопоставимы с литературными [148].

Информация об уровне опасности (взрывоопасность, пожароопасность, токсикологические свойства) цинаропикрина - не взрывоопасен, не пожароопасен. Информация о токсичности цинаропикрина не обнаружена.

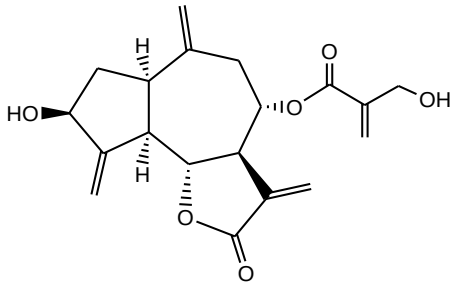
Таким образом, строение стандартного образца цинаропикрина однозначно установлена на основании ИК-, УФ-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. Представлены физико-химические и спектральные показатели стандартного образца цинаропикрина, которые необходимы для идентификации и количественного определения цинаропикрина в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

4.3.4 Оценка качества стандартного образца цинаропикрина

На сновании результатов анализов 3 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК, разработан проект АНД, регламентирующий качество стандартного образца цинаропикрина (таблица 6).

Спецификация качества включает в себя следующие показатели:

Определение: Цинаропикрин содержит не менее 94 % [3-гидрокси-8-(4'-гидроксиметакроил)-1,5,7α,8β(H)-гвай-4(15),10(14),11(13)-триен-12,6-олида].



$C_{19}H_{22}O_6$ M_r 346.37

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

Свойства:

- *Описание*. Маслообразное вещество с желтовато-зеленоватым оттенком, без запаха.

- *Растворимость*. Легко растворим в 96 % *этаноле Р*, мало растворим в *этилацетате Р*, *хлороформе Р*, практически нерастворим в *воде Р*.

Идентификация:

А. Инфракрасный спектр поглощения *(2.2.24) стандартного образца*, полученный в дисках с *калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг *калия бромида Р*), в области от 4000 см$^{-1}$ до 500 см$^{-1}$, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3428 (OH), 1756 (C=O γ-лактона), 1715 (метакриловый эфир), 1660 (C=C), 1641, 1453, 1376, 1270, 1151, 1056, 962, 910, 817.

В. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора стандартного образца в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 204±2 нм.

С. *Раствор ванилина в кислоте серной*. 0.1 г *ванилина Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р*. Раствор используют свежеприготовленным.

Таблица 6 - Показатели качества стандартного образца цинаропикрина

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Маслообразное вещество с желтовато-зеленоватым оттенком, без запаха.	Визуально
Растворимость	Легко растворим в 96 % *этаноле Р*, мало растворим в *этилацетате Р*, *хлороформе Р*, практически нерастворим в *воде Р*.	ГФ РК I, т. 1, *1.4*
Идентификация: - цинаропикрин	Инфракрасный спектр поглощения стандартного образца, полученный в дисках *с калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг *калия бромида Р*), в области от 4000 $см^{-1}$ до 500 $см^{-1}$, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3428 (OH), 1756 (C=O γ-лактона), 1715 (метакриловый эфир), 1660 (C=C), 1641, 1453, 1376, 1270, 1151, 1056, 962, 910, 817.	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.24*
- цинаропикрин	Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора стандартного образца в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 204±2 нм.	УФ-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.25*
- терпеноиды	К 20 мг стандартного образца цинаропикрина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной; появляется фиолетовое окрашивание.	В соответствии с АНД
Вода	Не более 0.5 %	ГФ РК I, т 1, *2.5.12*
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Не более 0.5 %	ГХ, ГФ РК I, т. 1, *2.2.28*
Родственные примеси	Не более 5.0 %.	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, *2.2.29*
Количественное определение	Не менее 94.0 %.	В соответствии с АНД
Хранение	В защищенном от света месте, при температуре от 2 ºС до 8 ºС.	В соответствии с АНД
Срок хранения	1 год	В соответствии с АНД

К 20 мг стандартного образца цинаропикрина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной, появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Испытания:

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

Испытуемый раствор. 30.0 мг СО цинаропикрина растворяют в 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят той же подвижной фазой до объема 25.0 мл. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Раствор сравнения. 30 мг СО цинаропикрина и 0.21 мг СО гроссгемина растворяют в 10 мл подвижной фазы при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят той же подвижной фазой 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 х 150 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм (например, Zorbax SB-C18);

–подвижная фаза *метанол – вода (50:50)*,

– скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;

– температура колонки комнатная;

– детектирование при длине волны 204 нм.

Время хроматографирования 25 мин.

Хроматографируют 20 мкл раствора сравнения.

Время удерживания пика цинаропикрина составляет около 13.53 мин. Относительное время удерживания пика примеси гроссгемина в стандартном образце должно быть около 6.92 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– коэффициент разделения пиков примеси гроссгемина и цинаропикрина составляет не менее 2.0;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цинаропикрина составляет не менее 3500 теоретических тарелок;

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

– коэффициент симметрии пика цинаропикрина 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 цинаропикрина на хроматограмме испытуемого раствора.

Не учитывают пики растворителей.

Сумма примесей не должна превышать 5.0 %.

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

Раствор внутреннего стандарта. 0.5 мл *пропанола Р* доводят *углерода тетрахлоридом Р* до объема 100.0 мл.

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

Раствор сравнения. По 0.5 мл *этанола Р* и *пропанола Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят *углерода тетрахлоридом Р* 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 х 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана *(5:95)* толщиной 0.25 мм;

– газ-носитель *аргон для хроматографии*, скорость 20 мл /мин;

– скорость водорода 40 мл /мин;

– скорость воздуха 400 мл /мин;

– температура колонки 30 ºС;

– температура детектора 120 ºС;

– температура испарителя 100 ºС.

Хроматографируют 0,2 мкл раствора сравнения.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола составляет не менее 30000 теоретических тарелок;

– коэффициент симметрии пика этанола составляет не более 2 %;

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

Хроматографируют 0,2 мкл испытуемого раствора.

Содержание этанола в стандартном образце 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 этанола на хроматограмме испытуемого раствора;

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

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

S_0 – площадь пика этанола на хроматограмме раствора сравнения;
m – масса навески стандартного образца в миллиграммах;
V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;
p – плотность этанола;
P – содержание этанола в образце этанола в процентах;
3 – разведение;
f – фактор пересчета, равный

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

Содержание C_2H_5OH (этанола) в стандартном образце цинаропикрина должно быть не более 0,5 %.

Количественное определение. Содержание цинаропикрина в стандартном образце цинаропикрина (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 цинаропикрина.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 ºС до 8 ºС.

Определение срока хранения стандартного образца цинаропикрина проводили по результатам исследования стабильности 3 серий опытной партии, заложенных на хранение в защищенном от света месте при температуре от 2 ºС до 8 ºС. Стандартный образец цинаропикрина хранили по 100 мг во флаконах типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренных пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатых колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконах импортных.

Оценку показателей качества проводили сразу после производства опытной партии стандартного образца цинаропикрина, затем через каждые 3 месяца в течение всего периода хранения (в соответствии с требованиями ГФ РК и разработанного нами проекта аналитического нормативного документа на стандартный образец цинаропикрина).

Показатели качества стандартного образца цинаропикрина всех серий отвечали нормам проекта аналитического нормативного документа «Цинаропикрин – стандартный образец» в течение всего периода хранения (таблица 7). В итоге установлен срок хранения стандартного образца цинаропикрина 1 год.

Таблица 7 - Результаты исследования стабильности стандартного образца цинаропикрина

Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количествен-ное определение
		Нормы отклонений по проекту АНД						
Серия 040114	06.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,36	0,02	3,19	96,43
	07.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,38	0,02	3,21	96,41
	07.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,37	0,02	3,20	96,41
	07.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,39	0,02	3,21	96,38
	08.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	0,37	0,02	3,21	96,40
Серия 050114	08.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,39	0,02	3,20	96,39
	09.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,37	0,02	3,22	96,39
	09.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,36	0,02	3,22	96,40
	09.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,38	0,02	3,20	96,40
	09.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	0,38	0,02	3,20	96,40
Серия 060114	09.01.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,37	0,02	3,19	96,42
	10.04.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,39	0,02	3,20	96,39
	10.07.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,38	0,02	3,22	96,38
	10.10.14	соответствует	соответствует	соответствует	0,38	0,02	3,21	96,39
	12.01.15	соответствует	соответствует	соответствует	0,37	0,02	3,21	96,40

78

Для введения цинаропикрина в Государственную фармакопею в качестве национального 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 цинаропикрина

2 Валидация методики определения родственных примесей

3 Сведения о лекарственном растительном сырье хартолепис средний трава

4 Валидация методики количественного определения цинаропикрина в траве хартолеписа среднего

5 Технологическая схема получения цинаропикрина

6 Производственная формула

7 Валидация технологического процесса получения цинаропикрина

8 Установление строения гроссгемина

9 Проект АНД. Лекарственное растительное сырье Хартолепис средний трава.

10 Проект АНД. Цинаропикрин – стандартный образец.

Таким образом, разработан проект АНД на цинаропикрин – стандартный образец (Приложение В). Цинаропикрин 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 (Приложение Б) [149].

4.4 Разработка лабораторного регламента получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина

Разработан и утвержден лабораторный регламент получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина (Приложение Г).

В лабораторный 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 и 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

Характеристика конечной продукции: Биологически активные сесквитерпеновые лактоны гроссгемина и цинаропикрина.

Наименования продукции: Стандартные образцы гроссгемина и цинаропикрина.

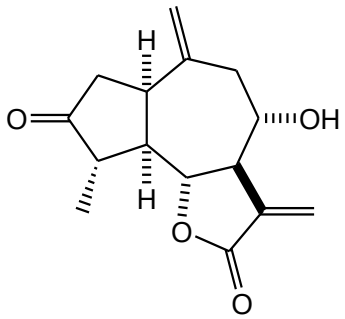
Основное назначение продукции. Стандартные образцы гроссгемина и цинаропикрина предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции:

Гроссгемин (**71**) [3-оксо-8-гидрокси-1,5,7α,4,8β(H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12, 6-олид].

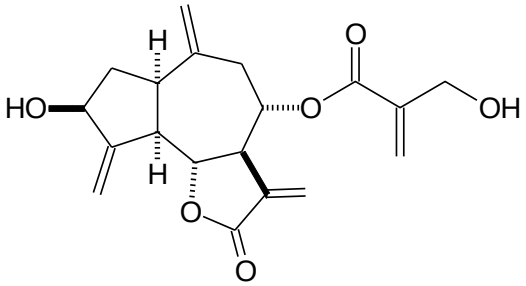
Цинаропикрин (**72**) [3-гидрокси-8-(4'-гидроксиметакроил)-1,5,7α, 8β(H)-гвай-4(15),10(14),11(13)-триен-12,6-олид].

Химические формулы:



$C_{15}H_{18}O_4$ М.м. 262

(**71**)



$C_{19}H_{22}O_6$ М.м. 346

(**72**)

Описание. Гроссгемин (**71**) - кристаллический порошок от белого до белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха. Содержание основного вещества не менее 98 %.

Цинаропикрин (**72**) - Маслообразное вещество с желтовато-зеленоватым оттенком, без запаха. Содержание основного вещества не менее 94 %.

Растворимость. Гроссгемин растворим в спирте этиловом 96 %, легко растворим в этилацетате, хлороформе, практически нерастворим в воде очищенной.

Цинаропикрин легко растворим в спирте этиловом 96 %, мало растворим в этилацетате, хлороформе, практически нерастворим в воде очищенной.

Идентификация. Инфракрасный спектр поглощения гроссгемина, 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 3474 (OH), 1740 (C=O γ-лактона), 1648 (C=C), 1399, 1167, 977, 921, 822, 685, 562, 482.

При добавлении к кристаллам гроссгемина капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора гроссгемина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

Элементный анализ гроссгемина: найдено %: С 68.80; Н 6.89; вычислено %: С 68.70; Н 6.87.

Чистота и подлинность гроссгемина определяется методом ВЭЖХ на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме и составляет не менее 98 % . Время удерживания гроссгемина: 7,0±1,0 мин.

Условия проведения качественного анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ:

-аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C_{18},

4,6 х 150 мм, с размером частиц 5 мкм;

-состав подвижной фазы: метанол-вода (1:1);

-детектирование при длине волны 204 нм;

-температура колонки - комнатная;

-скорость подвижной фазы 0,500 мл/мин;

-объем вводимой пробы 20 мкл.

Обработку результатов проводят с использованием программного обеспечения ChemStation.

Температура плавления гроссгемина от 201 до 203 ºС (спирт этиловый).

Инфракрасный спектр поглощения цинаропикрина, 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 3428 (ОН), 1756 (С=О γ-лактона), 1715 (метакриловый эфир), 1660 (С=С), 1641, 1453, 1376, 1270, 1151, 1056, 962, 910, 817.

При добавлении к цинаропикрину капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора цинаропикрина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 204±2 нм.

Элементный анализ цинаропикрина: найдено %: С 66.20; Н 6.64; вычислено %: С 65.90; Н 6.36.

Чистота и подлинность цинаропикрина определяется методом ВЭЖХ на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме, в условиях описанных выше, и составляет не менее 94 %. Время удерживания цинаропикрина: 13,0±1,0 мин.

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортировании и хранению.

Упаковка. По 100 мг во флаконы типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренных пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатых колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконы импортные.

Маркировка. На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название на государственном, латинском и русском языках, массу стандартного образца, условия хранения, регистрационный

номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

Химические превращения при получении стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из густого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии отсутствуют, поэтому химическая схема не приводится.

Технологическая схема получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из густого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии представлена на рисунке 18.

Аппаратурная схема получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из густого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии приведены на рисунке 19.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка растворителей, пробы для установки FCPC-5000

ВР 1.1 Подготовка растворителей

Для подготовки стационарной фазы (СФ) и подвижной фазы (ПФ) для хроматографического разделения на установке FCPC-5000 отмеряют мерным цилиндром 3,0 л гептана, 3,0 л ацетонитрила, 3,0 л этилацетата и 3,0 л воды очищенной, смешивают в делительной воронке объемом 25 л, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин и оставляют на 40 мин расслаиваться. Далее сливают нижний слой (подвижная фаза) 4,0 л и верхний слой (стационарная фаза) 6,5 л, передают на ВР 1.2, 1.3 и 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) густого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего, затем количественно переносят в стеклянный стакан объемом 1,0 л и растворяют в 200 мл подвижной фазы и 150 мл стационарной фазы и передают на ТП 1.1.

ВР 1.3 Включение установки FCPC-5000 и стабилизация системы

Включают термостат ротора FCPC, компрессор, насос, детектор, контрольный модуль и компьютер установки FCPC-5000. Открывают программу Respoden (программа управления установки FCPC-5000) 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 мин со скоростью 100-300 мл/мин. По окончании заполнения коммуникаций вентиль направления потока переключают в рабочее положение.

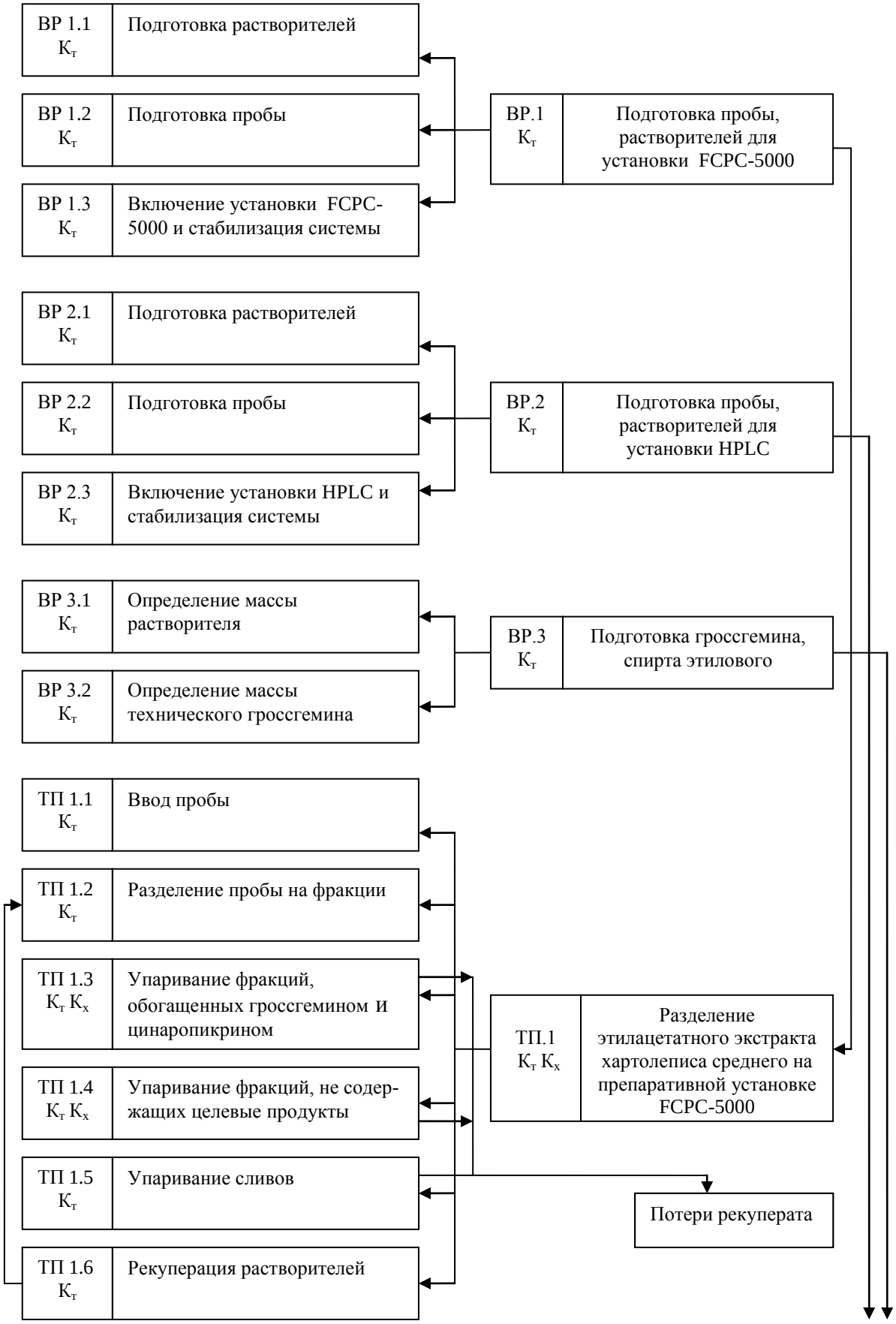
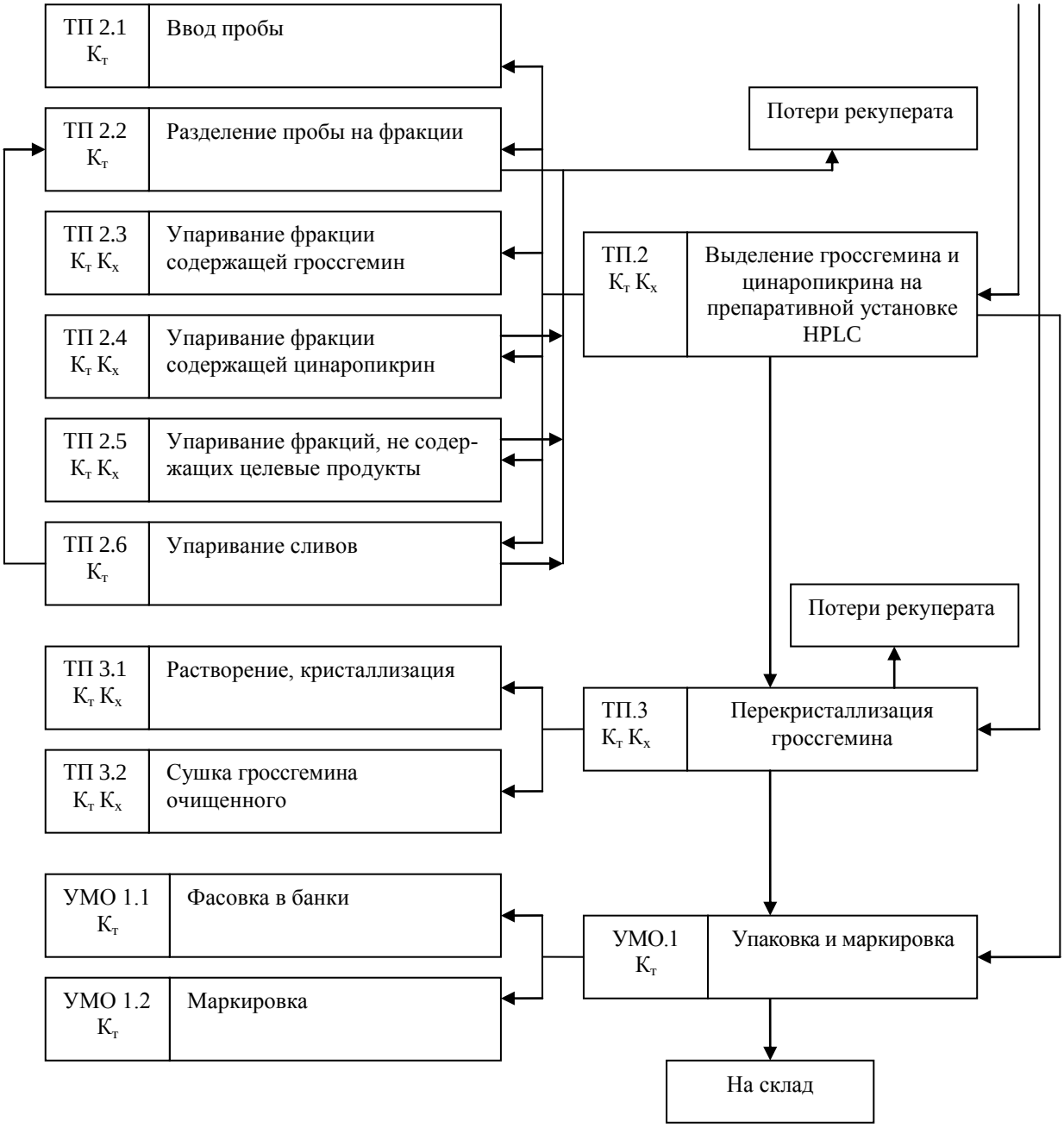


Рисунок 18 - Технологическая схема получения гроссгемина и цинаропикрина, Лист 1



$К_т$ – контроль технологический.
$К_х$ – контроль химический.

Рисунок 18, Лист 2

Стационарная фаза закачивается в ротор при помощи насоса установки FCPC-5000 со скоростью 100 мл/мин при скорости вращения ротора 500 об/мин. Время заполнения/промывки ротора 50-60 мин.

После 5 разделений осуществляется смена стационарной фазы (промывка ротора) при аналогичных условиях.

Стабилизация системы установки FCPC-5000 проводится при подаче подвижной (мобильной) фазы в ротор с помощью насоса со скоростью 100 мл/мин, при скорости вращения ротора 1000 об/мин. Время стабилизации системы (уравновешивания ротора) 10-15 мин. После чего установка FCPC-

5000 готова для хроматографического разделения (ТП 1).

ВР.2 - Подготовка растворителей, пробы для установки HPLC

ВР 2.1 Подготовка растворителей

Для подготовки подвижной фазы (ПФ) для хроматографического разделения на установке HPLC отмеряют мерным цилиндром 10,0 л ацетонитрила и 10,0 л воды очищенной, смешивают в стеклянном бутыли объемом 20 л, тщательно перемешивают в течение 5-10 мин и дегазируют. Далее подвижную фазу в количестве 20,0 л, передают на ВР 2.2, 2.3 и ТП 2.

ВР 2.2 Подготовка пробы

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г) 10,0 г (точная навеска) суммарной фракции, содержащей гроссгемин и цинаропикрин, затем количественно переносят в стеклянный стакан объемом 1,0 л и растворяют при нагревании в 700 мл подвижной фазы и передают на ТП 2.1.

ВР 2.3 Включение установки HPLC и стабилизация системы

Включают насос, насос для ввода пробы, детектор и компьютер установки HPLC. Открывают программу System Control (программа управления установки HPLC) и активируют метод для промывки системы. Вентиль направления потока переключают в положение промывки, т.е. минуя колонку установки, и прокачивают коммуникации подвижной фазой и пробой соответственно для удаления воздуха в течение 5 мин со скоростью 100 мл/мин. По окончании заполнения коммуникаций вентиль направления потока переключают в рабочее положение.

Стабилизация системы установки HPLC проводится при подаче подвижной в систему с помощью насоса со скоростью 100 мл/мин. Время стабилизации системы 60 мин. После чего установка HPLC готова для хроматографического разделения (ТП 2).

ВР.3 - Подготовка гроссгемина, спирта этилового

ВР 3.1 Определение массы растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л этилового спирта и передают на ТП 3.1.

ВР 3.2 Определение массы технического гроссгемина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 30,0 гр. (точная навеска) гроссгемина и передают на ТП 3.1.

Стадии технологического процесса

ТП. 1 – Разделение густого этилацетатного экстракта хартолеписа среднего на препаративной установке FCPC-5000

Активируют метод хроматографического разделения, который включает: 1) эквилибровку (5 минут со скоростью подачи мобильной фазы 10 мл/мин, запуск вращения и разгон ротора до скорости 1000 об/мин), 2) ввод пробы (3,5 минут со скоростью 100 мл/мин) и 3) разделение пробы на фракции (90 мин со скоростью подачи мобильной фазы 30 мл/мин, скорость вращения ротора 1000 об/мин).

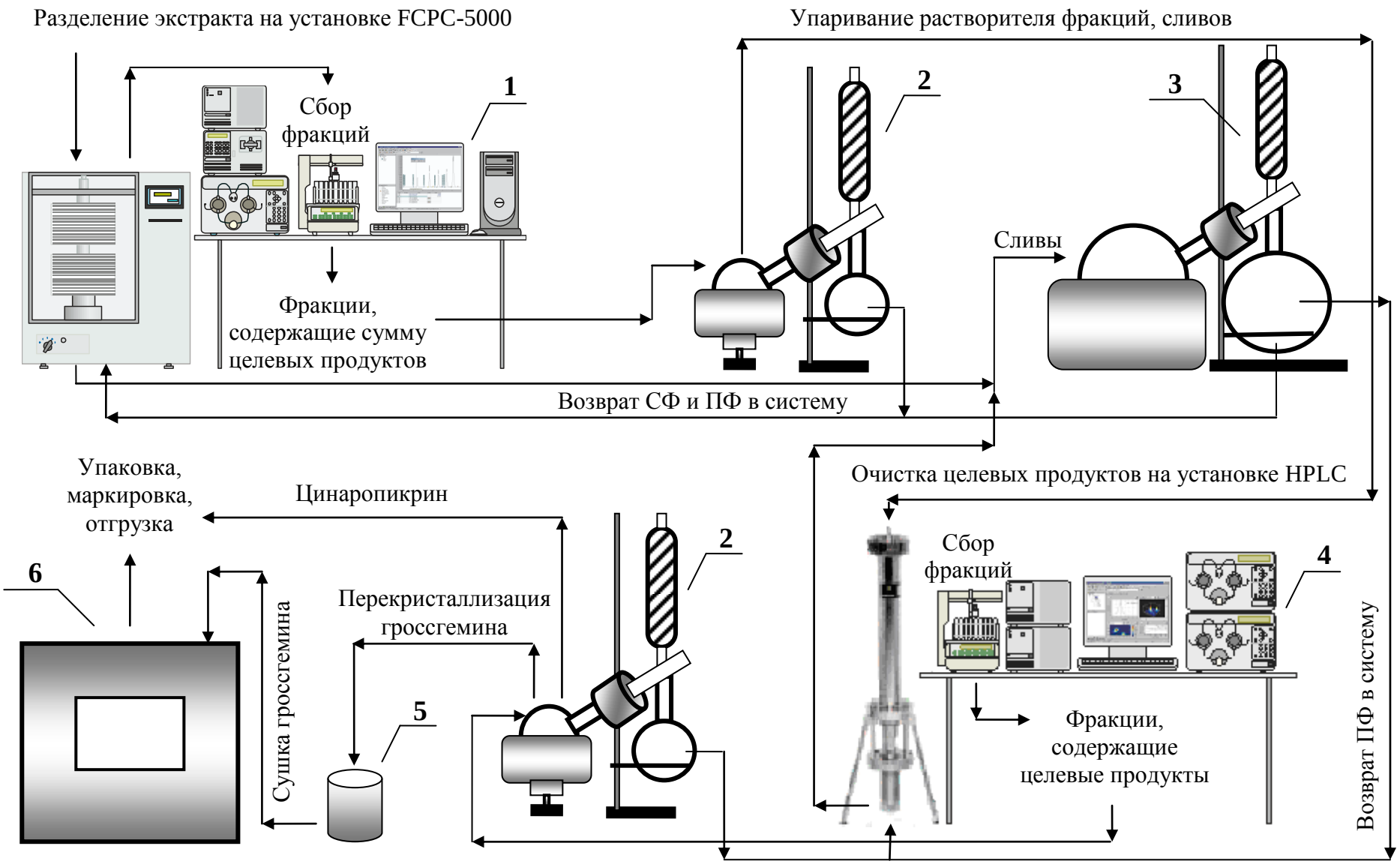


Рисунок 19 – Аппаратурная схема получения гроссгемина и цинаропикрина

ТП 1.1 Ввод пробы

Проба закачивается в ротор при помощи насоса установки FCPC-5000 со скоростью 100 мл/мин в течение 3,5 мин. Объем вводимой пробы 350 мл.

ТП 1.2 Разделение пробы на фракции

Разделение проводится при скорости подачи мобильной фазы 30 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 об/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 1,5 ч. УФ-детектирование при 220 нм.

Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, переключением вентилей направления потока, согласно получаемой хроматограмме: при появлении первого пика (через 20-30 мин) переключают вентиль 1 и собирают первую фракцию. Далее проводят сбор фракций согласно полученной хроматограмме переключением вентилей 2-8 до окончания выхода пробы (показание детектора 0-2 AU). Таким образом, в результате разделения получают 8 фракций объемом от 100 до 300 мл.

По окончании разделения скорость подачи мобильной фазы снижают до 10 мл/мин и выключают ротор, после его полной остановки отключают насос.

В день проводят 5-7 разделений.

Фракцию, содержащую сумму гроссгемина и цинаропикрина, передают на ТП 1.3.

Фракции, не содержащие целевые продукты, передают на ТП 1.4.

ТП 1.3 Упаривание фракции, обогащенных гроссгемином и цинаропикрином

Фракцию, обогащенную гроссгемином и цинаропикрина (фракции № 4), упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают на ТП 2.

ТП 1.4 Упаривание фракций, не содержащих целевые продукты

Фракции, не содержащие целевые продукты, упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают для анализа на наличие гроссгемина и цинаропикрина. Качественный анализ фракций проводят методом ВЭЖХ в условиях описанных выше.

ТП 1.5 Упаривание сливов

Сливы стационарной и мобильной фазы упаривают на ротационном испарителе PILOT VAP-50 или аналогичном. Остаток передают для анализа на наличие гроссгемина и цинаропикрина. Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы передают на ТП 1.6. Качественный анализ сухого остатка проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных выше.

ТП 1.6 Рекуперация растворителей

Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы заливают в делительную воронку объемом 25 л, тщательно встряхивают в течение 5 мин и отстаивают в течение 1 ч. Далее стационарную и мобильную фазы разделяют и передают на ТП 1.2.

ТП.2 - Выделение гроссгемина и цинаропикрина на препаративной установке HPLC

Активируют метод хроматографического разделения, который включает: ввод пробы (7,0 минут со скоростью 100 мл/мин) и разделение пробы на фракции (30 мин со скоростью подачи мобильной фазы 250 мл/мин).

ТП 2.1 Ввод пробы

Проба закачивается в систему при помощи насоса установки HPLC со скоростью 100 мл/мин в течение 7,0 мин. Объем вводимой пробы 700 мл.

ТП 2.2 Разделение пробы на фракции

Разделение проводится на колонке 250x100 мм, заполненной сорбентом «Microsorb 60-8 C18» (10 мкм) при скорости подачи мобильной фазы 250 мл/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 30 мин. УФ-детектирование при 220 нм.

Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, переключением, согласно получаемой хроматограмме: при появлении первого пика начинают сбор фракций, согласно полученной хроматограмме до окончания выхода пробы (показание детектора 0-10 mAU). В результате разделения получают 5 фракций объемом от 100 до 300 мл.

Фракцию, содержащую гроссгемин, передают на ТП 2.3.

Фракцию, содержащую цинаропикрин, передают на ТП 2.4.

Фракции, не содержащие целевые продукты, передают на ТП 2.5.

ТП 2.3 Упаривание фракции, содержащей гроссгемин

Фракцию, содержащую гроссгемин (фракции № 2), упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают на ТП 3.

ТП 2.4 Упаривание фракции, содержащей цинаропикрин

Фракцию, содержащую цинаропикрин (фракции № 4), упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном. Полученный цинаропикрин досушивают при комнатной температуре.

Чистота цинаропикрина определяется методом ВЭЖХ на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме, в условиях описанных выше, и составляет не менее 94 %. Время удерживания цинаропикрина: 13,0±1,0 мин.

Инфракрасный спектр поглощения цинаропикрина, 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 3428 (OH), 1756 (C=O γ-лактона), 1715 (метакриловый эфир), 1660 (C=C), 1641, 1453, 1376, 1270, 1151, 1056, 962, 910, 817.

При добавлении к цинаропикрину капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора цинаропикрина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 204±2 нм.

Элементный анализ цинаропикрина: найдено %: C 66.20; H 6.64; вычислено %: C 65.90; H 6.36.

После качественного анализа передают на УМО.1.

ТП 2.5 Упаривание фракций, не содержащих целевые продукты

Фракции, не содержащие целевые продукты, упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают для анализа на наличие гроссгемина и цинаропикрина. Качественный анализ фракций проводят методом ВЭЖХ в условиях описанных выше.

ТП 2.6 Упаривание сливов

Сливы мобильной фазы упаривают на ротационном испарителе PILOT VAP-50 или аналогичном. Остаток передают для анализа на наличие гроссгемина и цинаропикрина. Полученные отгоны мобильной фазы передают на ТП 2.2. Качественный анализ сухого остатка проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных выше.

ТП.3 - Перекристаллизация гроссгемина

ТП 3.1 Растворение, кристаллизация

Гроссгемин технический, полученный на стадии ТП.2, подвергают перекристализации. Испарительную колбу с гроссгемином техническим устанавливают на водяную баню при температуре 80-90 ^{0}С и растворяют в 96 % этиловом спирте. Этиловый спирт добавляют постепенно до момента полного растворения гроссгемина. Чтобы снизить потери спирта используют обратный холодильник.

После полного растворения гроссгемина колбу снимают с водяной бани и постепенно охлаждают (сначала при комнатной температуре 1 час, затем в холодильнике при 25 ^{0}С – 1 час). При этом в колбе постепенно начинают выпадать кристаллы гроссгемина в виде мелкого кристаллического порошка.

Полученный очищенный гроссгемин передают на ТП 3.2.

ТП 3.2 Сушка гроссгемина очищенного

После кристаллизации гроссгемин 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 ^{0}С и давлении –0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы. Гроссгемин должен иметь вид мелкого кристаллического порошка белого цвета без запаха.

Чистота полученного гроссгемина очищенного, определяется методом ВЭЖХ в условиях описанных выше. Время удерживания гроссгемина 7±1 мин. Чистота гроссгемина очищенного должна составлять не менее 98,0 %.

Инфракрасный спектр поглощения субстанции гроссгемина, 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 3474 (ОН), 1741 (С=О γ-лактона), 1648 (С=С), 1399, 1167, 977, 921, 822, 685, 562, 482.

При добавлении к субстанции капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции гроссгемина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

Элементный анализ: найдено %: С 68.80; Н 6.89; вычислено %: С 68.70; Н 6.87.

Полученный сухой очищенный гроссгемин передается на УМО.1.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции гроссгемина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 100 мг во флаконы типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренных пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатых колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконы импортные.

УМО 1.2 Маркировка

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

Проведена валидация технологического процесса получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина, в ходе получения валидационной серии отклонения от лабораторного регламента отсутствовали. В результате, установлено, что технологический процесс получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина стабилен и приводит к получению продукта требуемого качества. Основным фактором риска, который может повлиять на количественный выход продукта, является меньшее или большее содержание гроссгемина и цинаропикрина в лекарственном ратительном сырье хартолеписа среднего.

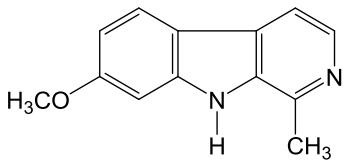
Таким образом, разработан и утвержден лабораторный регламент получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина (ЛР-40761819-07-14) (Приложение Г). По результатам валидации технологический процесс получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина соответствует лабораторному регламенту, стабилен и приводит к получению требуемого количества продуктов соответствующего качества.

4.5 Новый способ выделения и очистки гармина

В плане разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых оригинальных высокоэффективных фитопрепаратов перспективным объектом является *Peganum harmala* L. (гармала обыкновенная) – источник биологически активного алкалоида гармина [125].

Гармин (**73**) – индольный алкалоид β-карболинового типа, порошок белого с желтоватым оттенком цвета состава $C_{13}H_{12}N_2O$, с т.пл. 265-268 ^{o}C.

Гармин (**73**) обладает противомикробной, противогрибковой, противоопухолевой, цитотоксической, антиоксидантной, антимутагенной и галлюциногенной активностями [150]. Установлено, что гидрохлорид гармина обладает антипаркинсоническим и нейротропном действием и является перспективным для разработки нового лекарственного препарата [151].



(73)

Гармин необходим в качестве отечественного стандартного образца для постадийного контроля производства и оценки качества нейротропного лекарственного средства «Гармина гидрохлорид» в ряду сырье – субстанция – готовая лекарственная форма.

Ранее для наработки гармина применялись следующие способы:

– 3,5 кг измельченных корней гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) смачивали 5 %-ным раствором соды и исчерпывающе экстрагировали хлороформом (при 40 °С). После упаривания растворителя получили 220 г суммы веществ с выходом 3,23 % (от веса воздушно-сухого сырья). Смолку посадили на колонку с Al_2O_3 в соотношении 1:20. При элюировании колонки бензолом выделено кристаллическое, оптически неактивное соединение (145), с т.пл. 265-268 °С (разл.), выход 0,285 % (10 г).

– 6,885 кг измельченных корней гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) экстрагировали 96 % этанолом. Получено 648 г суммы экстрактивных веществ с выходом 9,41 % (от веса воздушно-сухого сырья). Для наработки и очистки гармина полученная сумма веществ подвергалась хроматографированию на колонке с Al_2O_3 (II ст. активности). При элюировании колонки этанолом выделено кристаллическое вещество, которое по физико-химическим константам и спектральным данным идентифицировали как индольный алкалоид - гармин (**73**), состава $C_{13}H_{12}N_2O$, М.в.: 212.09, т.пл. 265-268 °С, выход 1,23 % (85 г).

– 24,3 кг сухих измельченных надземных частей исчерпывающе извлекали 80 % изопропиловым спиртом. Экстракт упаривали до объема 15 л и подкислили 4 л 25 % уксусной кислоты. Хлорофилл и другие вещества неосновного характера удалили повторным встряхиванием с эфиром; кислую вытяжку подщелочили 25 % аммиаком и подвергли извлечению хлороформом. Полукристаллическую массу, оставшуюся после упаривания хлороформного экстракта растерли с ацетоном. Ацетоновый фильтрат упарили в вакууме, остаток растворили в хлороформе и алкалоиды извлекли 5% уксусной кислотой. Из уксуснокислого экстракта после подщелачивания и извлечения хлороформом получили 114 г смолистой смеси оснований, которую растворяли в 800 л сухого хлороформа и хроматографировали на Al_2O_3, при элюировании смесью хлороформ:метанол (99:1) получили 0,6 г основания с т.пл. 265-268 °С, на основание сплавления с образцом, выделенное вещество идентифицировано как гармин (**73**), выход составил 0,025 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [152].

– в методике [153] сырье *Peganum harmala* L. исчерпывающе экстрагируют метанолом, полученный при сгущении экстракт корней, обрабатывают смесью этилацетат-вода. Колоночной хроматографией из

наработанной суммы алкалоидов изолировали три алкалоида гармин, гармалин и гармалицин.

− растительное сырье *Peganum harmala* L. (корни) экстрагировали хлороформом, с последующей обработкой полученного экстракта 10 %-ной серной кислотой. Кислотные вытяжки промывают диэтиловым эфиром с дальнейшим подщелачиванием концентрированным аммиаком. В результате получают фракцию Б, из которой после повторной очистки кислотой получили сумму алкалоидов с выходом 0,3 % от воздушно-сухого сырья. Оставшиеся в водном маточнике основания извлекают хлороформом (фракция А). Перекристаллизацией фракции А из этилового спирта отделяют dl-пеганин (0,3 % от веса сырья). Из спиртового маточника после добавления хлорной кислоты, выделяют перхлорат дезоксипеганина (0,11 % от веса сырья). При подщелачивании маточник перхлората переводят в основание (фракция С), из которой перекристаллизацией из спирта выделяют dl-пеганин. Из оставшегося маточника, объеденным с фракцией С, выделяют смесь алкалоидов – дезоксивазицинона (0,06 %) и вазицинона (0,05 % от веса сырья), которую разделяют на колонке. При обработке фракции С раствором азотной кислоты получают нитрат гармина, который составляет 0,02 % от веса сырья [154].

Как видно, из приведенных выше способов выделение гармина и из гармалы обыкновенный достаточно длительный и трудоемкий процесс, требующий использования значительного объема органических растворителей, не соответствующих международным стандартам GMP, а также предусматривает работы с килотами и щелочами, что также усложняет процесс получания гармина.

Поэтому разработка и внедрение в производство нового способа получения гармина из сухого этанольного экстракта гармалы обыкновенной является актуальной задачей.

Для успешного разделения методом ЦХР проведен подбор оптимальной системы растворителей, которая обеспечит количественные выходы качественных целевых продуктов.

На первом этапе проведен подбор системы растворителей для разделения на установке FCPC-A200 спиртового экстракта гармалы обыкновенной, при этом использовались следующие смеси растворителей:

1) этилацетат:этанол:вода (5:1:4);
2) этилацетат:этанол:вода (5:2:3);
3) этилацетат:ацетонитрил:вода (5:1:4).

Двухфазная система для разделения спиртового экстракта гармалы обыкновенной подобрана согласно коэффициенту распределения (K) гармина, между двумя не смешивающимися фазами, значение K гармина оценивали по анализу методом ТСХ. Оптимальной системой растворителей для выделения и очистки гармина из спиртового экстракта определена смесь этилацетат: этанол:вода (5:1:4), в качестве подвижной фазы будет использован нижний слой системы.

Затем проведено экспериментальное разделение с применением центробежной хроматографии распределения на установке FCPC-A200 для выделения и очистки гармина из этанольного экстракта гармалы обыкновенной.

Разделение № 1: ротор 250 мл, система растворителей этилацетат: этанол:вода (5:1:4), проба 0,05 г в 5 мл верхней (стационарной) фазы и 5 мл подвижной фазы, 10 мл пробы ввели в хроматограф, УФ-детектирование 280, 301, 360, 380 нм, скорость вращения ротора 1200 об/мин, метод разделения двойной – элюирование и экструзия:

- элюирование – нисходящий метод (подача элюента сверху вниз), подвижная фаза – нижний слой (полярный), скорость подачи элюента 5 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин., наработано 40 фракции;

- экструзия - нисходящий метод (подача элюента сверху вниз), подвижная фаза – верхний слой (неполярный), скорость подачи элюента 20 мл/мин, сбор фракций осуществляли через 1 мин., наработано 13 фракций.

Фракции упарили на ротационном испарителе и провели анализ методом ВЭЖХ. В результате разделения получены фракции 1-7, содержащие от 72 до 87 % гармина (рисунок 19-22), которые были объединены.

После упаривания растворителя и перекристаллизации получен гармин с чистотой 99,03 %. Выход гармина составил 6 мг или 12 % в пересчете на массу экстракта (1,36 % в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Экспериментально установлено, что оптимальным способом для выделения и очистки гармина из этанольного экстракта гармалы обыкновенной, обеспечивающим количественный выход качественного целевого продукта, является центробежная хроматография распределения.

Таким образом, разработан новый способ выделения и очистки гармина из этанольного экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения [155].

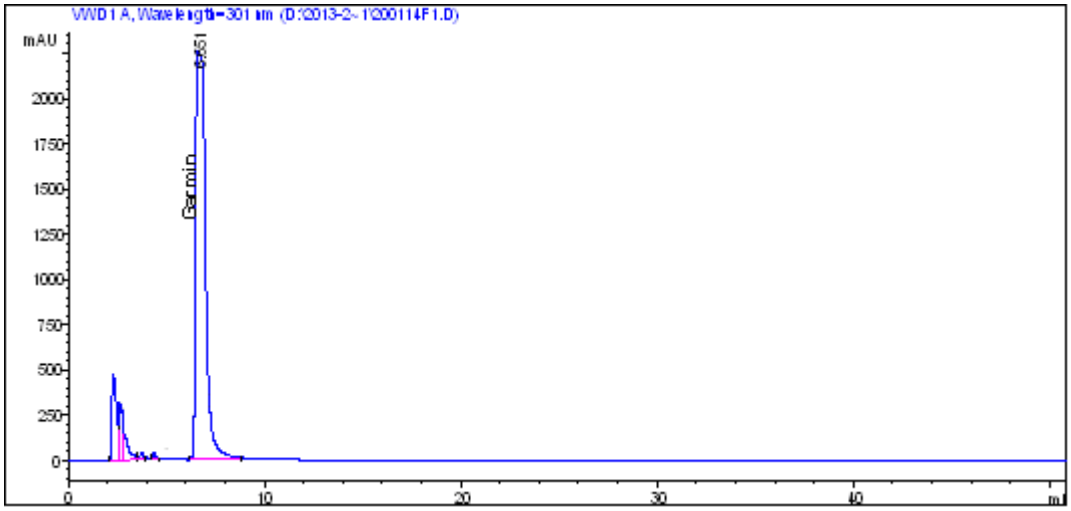


Рисунок 19 - Хроматограмма фракции 1 с содержанием гармина 84,70 %

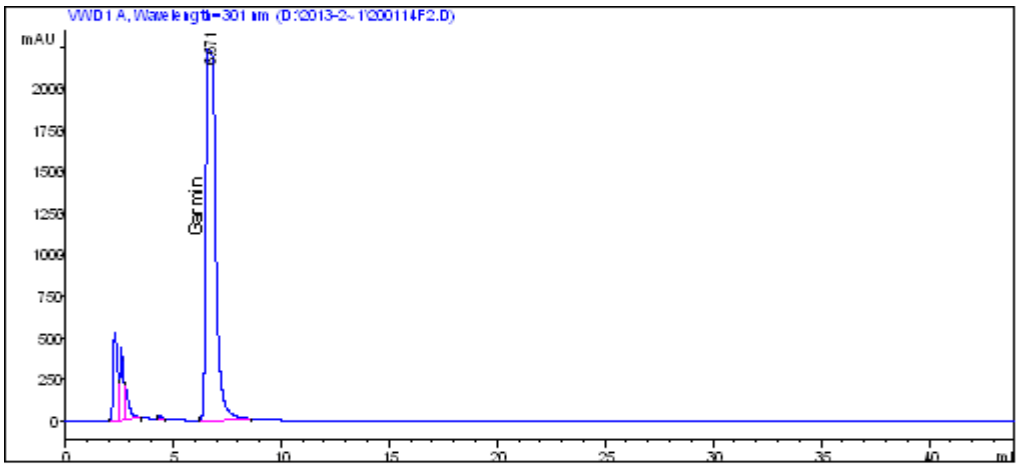


Рисунок 20 - Хроматограмма фракции 2, с содержанием гармина 82,84 %

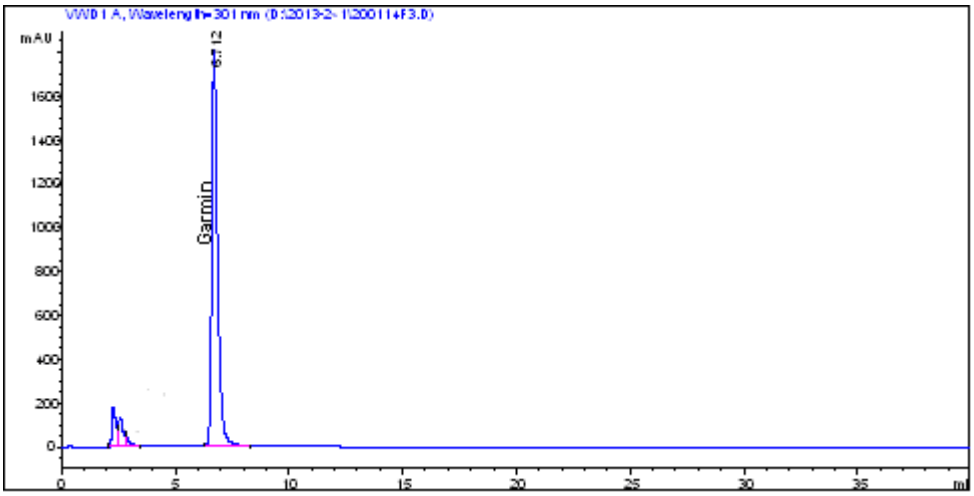


Рисунок 21 - Хроматограмма фракции 3 с содержанием гармина 87,50 %

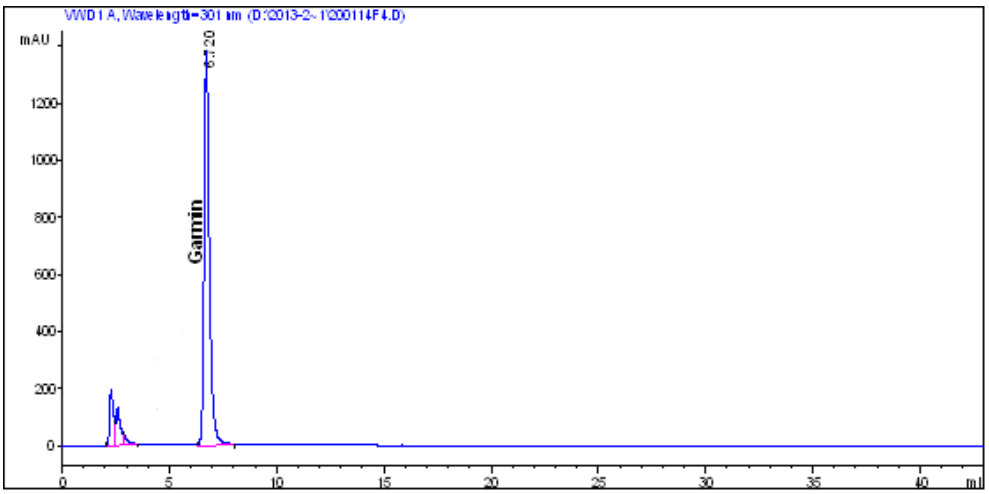


Рисунок 22 - Хроматограмма фракции 4 с содержанием гармина 83,28 %

4.6 Разработка технологии получения стандартного образца гармина

Для того, чтобы обеспечить стабильную наработку необходимого количества СО соответствующей чистоты, на основе нового способа, разработана технология получения стандартного образца гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения.

Данная технология включает в себя два этапа:

Первый этап: разделение спиртового экстракта гармалы обыкновенной на препаративной установке FCPC-5000.

Хроматографирование проводят в следующих условиях: ротор 5000 мл, система растворителей этилацетат: этанол:вода (5:1:4), проба - 40,0 г экстракта растворили в 400 мл стационарной фазы и 400 мл подвижной фазы, 800 мл пробы вводят в хроматограф, при скорости подачи мобильной фазы 30 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 об/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 1,5 часов. УФ-детектирование при 301 нм. Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, согласно получаемой хроматограмме. В результате разделения получают 5 фракций объемом от 100 до 1000 мл.

Фракцию, обогащенную гармином (фракцию № 2), упаривают на ротационном испарителе, получают гармин технический с чистотой 97 % по данным ВЭЖХ, массой 4,95 г.

Второй этап: Очистка гармина.

Гармин, содержащий сопутствующие вещества обрабатывают этилацетатом (марки х.ч.). После растворения сопутствующих веществ растворитель декантируют и в приемнике остается гармин, который сушат и получают гармин в количестве 4,8 г с чистотой 99,12 %, выход составляет 12,0 % в пересчете на массу экстракта.

Сравнение основных показателей технологий выделения гармина с использованием колоночной хроматографии (КХ) и с применением центробежной хроматографии распределения (ЦХР) представлены в таблице 8.

Как видно из таблицы 8, за счет сравнительной автоматизации и уменьшения продолжительности, увеличена производительность технологического процесса получения гармина в 6,5 раз. Эффективность разработанной технологии, при снижении трудозатрат в 2,0 раза, позволила снизить себестоимость целевого продукта в 5 раз.

Таким образом, разработана новая технология выделения и очистки гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения, обеспечивающая стабильную наработку необходимого количества продукта соответствующего качества. Эффективность разработанной технологии, при увеличении производительности в 6,5 раз и уменьшении трудозатрат, снижает себестоимость целевого продукта в 5 раз.

Таблица 8 - Сравнение основных показателей технологий выделения гармина 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 технологического процесса получения гармина	42,0 г	273 г	Увеличена в 6,5 раз
Выход гармина (в пересчете на экстракт)	12,0 %	12,0 %	-
Сорбент	Оксид алюминия – 1,5 кг	не используется	не используется
Расход растворителей	Этилацетат – 22,8 кг	этилацетат – 18 кг, этанол – 3,2 кг дистиллированная вода - 16 кг	Снижен расход растворителей (этилацетат)

4.7 Идентификация и контроль качества стандартного образца гармина

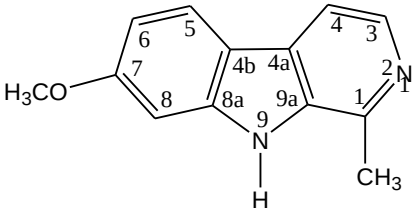
4.7.1 Идентификация стандартного образца гармина

Для включения гармина, в качестве национального стандартного образца в Государственную фармакопею Республики Казахстан, осуществлены исследования по описанию вещества визуальными методами и установлению структурной формулы с использованием ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа.

Гармин [7-метокси-1-метил-9Н-пиридо(3,4-*b*)индол] относится к индольным алкалоидам β-карболинового типа.

Гармин - кристаллический порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха, с температурой плавления от 265°С до 268°С, растворим в 96 % этаноле, легко растворим в метаноле, диметилформамиде, практически не растворим в воде. Данные сопоставимы с литературными [156].

Строение гармина установлено на основании данных ИК- и УФ-спектрофотометрии, масс-, ЯМР-спектрометрии, рентгеноструктурного и элементного анализа.



(73)

В ИК-спектре гармина (73) присутствуют интенсивные полосы поглощения, 3420 $см^{-1}$, 3142 $см^{-1}$ (NH), 2964 $см^{-1}$, 2832 $см^{-1}$ (OCH_3 фенильного фрагмента), 1626 $см^{-1}$ (-C=N), 1564 $см^{-1}$ и 1483 $см^{-1}$, 1452 $см^{-1}$. Данные соответствуют описанным в литературе [156].

В УФ-спектре данного соединения имеется максимум поглощения при длине волны 241 нм и 301 нм, типичный для индольного цикла, находящегося в сопряжении с ароматическим гетероциклом. Данные соответствуют описанным в литературе [156].

В ЯМР ^{1}H-спектре гармина в области 2.99, 3.96 м.д., проявляются два трехпротонных синглета метильной группы при С-7 и метоксильной группы при С-1, а также имеются сигналы протонов фенильного заместителя при 6.96 м.д. в виде дублет дублета Н-6, J=8.0 и сигналы протонов Н-8, Н-4, Н-5, Н-3, в виде дублетов при 7.08 м.д. (J=4.0), 8.06 м.д. (J=12.0), 8.14 м.д. (J=10.0), 8.18 м.д. (J=10.0) соответственно. Данные сопоставимы с литературными [1].

В ЯМР ^{13}C-спектре гармина присутствуют 6 синглетных сигнала при 137.11, 164.68, 147.02, 134.09, 129.0, 114.72 м.д. характерные для углеродных атомов С1, 7, 8а, 9а, 4а и 4b, а также 5 дублетных сигнала при 134.75, 114.16, 124.61, 114.60, 94.94 м.д. углеродных атомов С3, 4, 5, 6, 8 и в области 56.24, 15.94 м.д. обнаружены 2 квартетных сигнала относящихся $-CH_3$, $-OCH_3$ группам. Данные сопоставимы с литературными [156].

В масс-спектре гармина присутствует пик молекулярного иона *m/z* 212 (100%) $[M]^+$, что соответствует молекулярному весу. Наличие фрагмента с *m/z* 169 обусловлено потерей молекулярным ионом метоксильной группы и атома азота в ароматическом кольце. Фрагменты *m/z* 115 $(M - C_5H_7NO)^+$ и *m/z* 106 $(M - C_6H_4NO)^+$ подтверждают наличие атома азота в индольном кольце. Данные сопоставимы с литературными [156] (рисунок 23).

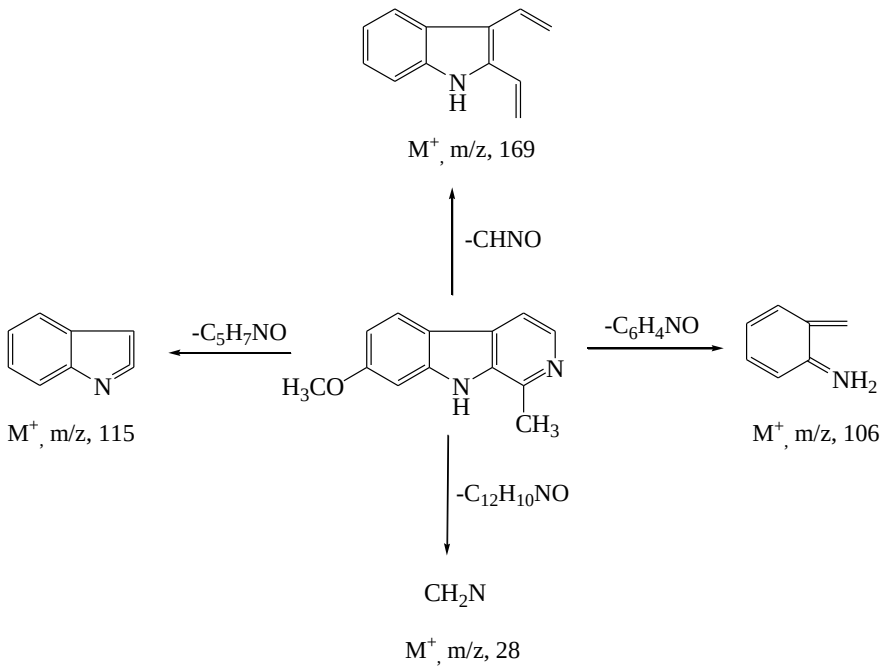


Рисунок 23 - Схема фрагментации гармина по масс-спектру

Элементный анализ: найдено %: N 13.19; C 73.57; H 5.69; вычислено %: N13.16; C 73.32; H 5.81.

Пространственное строение молекулы гармина установлено по данным рентгеноструктурного анализа (рисунок 24).

Структура расшифрована прямыми методами и уточнена полноматричным МНК в анизотропном приближении для неводородных атомов. Основной остов молекулы плоский с точностью ±0.03 E, атом C11, O12 и C13 находятся практический в этой плоскости с выходом на 0.10, 0.10 и 0.15 E соответственно.

Все расчеты выполнены с применением комплекса программ SHELXS-97 и SHELXL-97. Координаты атомов молекулы гармина депонированы в Кембриджском банке структурных данных. Данные сопоставимы с литературными [157].

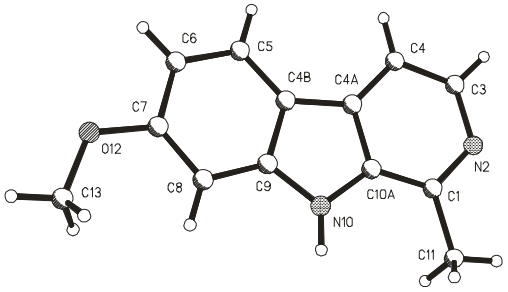


Рисунок 24 - Пространственное строение молекулы гармина
по данным рентгеноструктурного анализа

Таким образом, строение и подлинность стандартного образца гармина однозначно установлена на основании ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа. Описаны физико-химические и спектральные показатели стандартного образца гармина, которые будут применяться для идентификации и количественного определения гармина в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

4.7.2 Контроль качества стандартного образца гармина

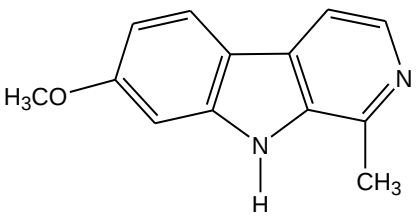
На сновании результатов анализов 3 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК, разработан проект АНД, регламентирующий качество стандартного образца гармина (таблица 9).

Спецификация качества стандартного образца гармина включает в себя следующие показатели:

Определение: Гармин содержит не менее 98 % [7-метокси-1-метил-9Н-пиридо(3,4-*b*)индола]

Таблица 9 - Спецификация качества стандартного образца гармина

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.	Визуально
Растворимость	Растворим в 96 % *этаноле Р*, *метаноле Р* и *диметилформамиде Р*, практически не растворим в *воде Р*.	ГФ РК I, т. 1, *1.4*
Идентификация: - гармина	Инфракрасный спектр поглощения (*2.2.24*) стандартного образца, полученный в дисках с *калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 3800 $см^{-1}$ до 600 $см^{-1}$, должен иметь полосы поглощения при 3420 $см^{-1}$, 3142 $см^{-1}$ (NH), 2964 $см^{-1}$, 2832 $см^{-1}$ (OCH_3 фенильного фрагмента), 1626 $см^{-1}$ (-C=N), 1564, 1483, 1452.	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.24*
- гармина	Ультрафиолетовый спектр 0.01 % раствора стандартного в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при длине волн 241 ± 2 нм и 301 ± 2 нм.	УФ-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, *2.2.25*
- алкалоиды	К 20 мг стандартного образца гармина, растворенного в этаноле, прибавляют 1 каплю раствора кислоты кремне-вольфрамовой; выпадает осадок белого цвета.	В соответствии с АНД
Температура плавления	От 265 °С до 268 °С.	ГФ РК I, т. 1, *2.2.14*
Вода	Не более 0.5 %	ГФ РК I, т 1, *2.5.12*
Остаточные количества органических растворителей (этилацетат)	Не более 0.5 %	ГХ, ГФ РК I, т. 1, *2.2.28*
Родственные примеси	Не более 1.0 %.	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, *2.2.29*
Количественное определение	Не менее 98.0 %.	В соответствии с АНД
Хранение	В защищенном от света месте, при температуре от 2 ºС до 8 ºС.	В соответствии с АНД
Срок хранения	1 год	В соответствии с АНД



$C_{13}H_{12}N_2O$ M_r 212,25

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

Свойства:

- *Описание*. Порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.
- *Температура плавления*. От 265 °С до 268 °С.
- *Растворимость*. Растворим в 96 % *этаноле Р*, *метаноле Р* и *диметилформамиде Р*, практически не растворим в *воде Р*.

Идентификация:

А. Инфракрасный спектр поглощения (*2.2.24*) стандартного образца, полученный в дисках с *калия бромидом Р* (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 3800 $см^{-1}$ до 600 $см^{-1}$, должен иметь полосы поглощения при 3420 $см^{-1}$, 3142 $см^{-1}$ (NH), 2964 $см^{-1}$, 2832 $см^{-1}$ (OCH_3 фенильного фрагмента), 1626 $см^{-1}$ (-C=N), 1564, 1483, 1452.

В. Ультрафиолетовый спектр 0.01 % раствора стандартного образца в *96 % этаноле Р* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при длине волн 241 ± 2 нм и 301 ± 2 нм.

С. *Раствор кислоты кремневольфрамовой в воде*. 1 г *кислоты кремневольфрамовой Р* растворяют в *воде Р* и объем доводят *водой Р* до 100 мл.

К 20 мг стандартного образца гармина, растворенного в этаноле, прибавляют 1 каплю раствора кислоты кремневольфрамовой; выпадает осадок белого цвета (алкалоиды).

Испытания:

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

Испытуемый раствор. 30.0 мг СО гармина растворяют в 10 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1) 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. 30.0 мг СО гармина и 0.21 мг СО вазицинона растворяют в 10 мл смеси *ацетонитрил Р - вода Р* (1:1) 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 х 150 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм; (например, Zorbax SB-C18);

– подвижная фаза *ацетонитрил Р – раствор аммиака Р* (1:1). (41 г *раствора аммиака концентрированного Р* доводят *водой Р* до объема 500 мл).

– скорость подвижной фазы 0.25 мл/мин;

– температура колонки комнатная;

– детектирование при длине волны 301 нм.

Время хроматографирования 25 мин.

Хроматографируют 20 мкл раствора сравнения.

Время удерживания гармина составляет 14.1 мин. Относительное время удерживания пика примеси вазицинона в стандартном образце около 4.1 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– коэффициент разделения пиков примеси вазицинона и гармина составляет не менее 4.3;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гармина, составляет не менее 3000 теоретических тарелок;

– относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика гармина, составляет не более 2.0 %;

– коэффициент симметрии пика гармина составляет не более 2.0.

Хроматографируют 20 мкл испытуемого раствора.

Содержание суммы примесей 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 гармина 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 Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора *96 % этанолом Р* до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. 150.0 мг стандартного образца растворяют в 3.0 мл раствора внутреннего стандарта.

Раствор сравнения. 0.5 мл *этилацетата Р* и *углерода тетрахлорида Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора *96 % этанолом Р* до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

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

– колонка капиллярная размером 30 м х 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана *(5:95)* толщиной 0.25 мм;

– газ-носитель *аргон для хроматографии*, 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 2.0 %;

– относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика этилацетата, составляет не более 2.0 %.

Хроматографируют 0.2 мкл испытуемого раствора.

Содержание этилацетата в стандартном образце в процентах рассчитывают по формуле:

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

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 стандартного образца в миллиграммах;

V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;

p – плотность этилацетата;

P – содержание этилацетата в образце этилацетата в процентах;

З – 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 гармина должно быть не более 0,5 %.

Количественное определение. Содержание гармина в стандартном образце гармина (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 гармина.

Хранение. При температуре от 2 °С до 8 °С.

Срок хранения стандартного образца гармина определен по результатам исследования стабильности 3 серий опытной партии, заложенных на хранение в защищенном от света месте при температуре от 2 ºС до 8 ºС. Стандартный образец гармина хранили по 100 мг во флаконах типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренных пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатых колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконах импортных.

Контроль показателей качества проводили сразу после производства опытной партии стандартного образца гармина, затем через каждые 3 месяца в течение всего периода хранения (в соответствии с требованиями ГФ РК).

Показатели качества стандартного образца гармина всех серий соответствовали требованиям проекта аналитического нормативного документа «Гармин – стандартный образец» в течение всего периода хранения (таблица 10). По результатам исследования определен срок хранения стандартного образца гармина 1 год.

Для введения гармина в Государственную фармакопею в качестве национального стандартного образца ГФ РК, 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 гармина;

2 Валидация методики определения родственных примесей;

3 Сведения о лекарственном растительном сырье хартолепис средний трава;

4 Валидация методики количественного определения гармина в траве хартолеписа среднего;

Таблица 10 - Результаты исследования стабильности стандартного образца гармина

Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Температура плавления	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количествен-ное определение
		Нормы отклонений по проекту АНД							
Серия 030214	06.02.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,10	0,88	98,89
	06.05.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,14	0,10	0,88	98,88
	06.08.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,11	0,87	98,89
	06.11.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,11	0,88	98,88
	09.02.15	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,14	0,10	0,88	98,88
Серия 040214	07.02.14	соответствует	соответствует	соответствует	265-267	0,14	0,10	0,87	98,89
	07.05.14	соответствует	соответствует	соответствует	265-267	0,13	0,11	0,88	98,88
	07.08.14	соответствует	соответствует	соответствует	265-267	0,14	0,11	0,88	98,87
	07.11.14	соответствует	соответствует	соответствует	265-267	0,14	0,11	0,87	98,88
	09.02.15	соответствует	соответствует	соответствует	265-267	0,14	0,10	0,88	98,88
Серия 050214	10.02.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,11	0,88	98,88
	12.05.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,12	0,12	0,89	98,87
	12.08.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,11	0,88	98,88
	12.11.14	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,13	0,11	0,88	98,88
	12.02.15	соответствует	соответствует	соответствует	266-268	0,14	0,10	0,89	98,87

5 Технологическая схема получения гармина;

6 Производственная формула;

7 Валидация технологического процесса получения гармина;

8 Установление строения гармина;

9 Проект АНД. Лекарственное растительное сырье гармала обыкновенная корни;

10 Проект АНД. Гармин – стандартный образец.

Таким образом, разработан проект АНД на гармин – стандартный образец (Приложение Д). Гармин 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 (Приложение Б).

4.8 Разработка лабораторного регламента получения стандартного образца гармина

Разработан и утвержден лабораторный регламент получения стандартного образца ГФ РК гармина (Приложение Е).

В лабораторный 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 и 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

Характеристика конечной продукции: Фармакологически активный алкалоид гармин.

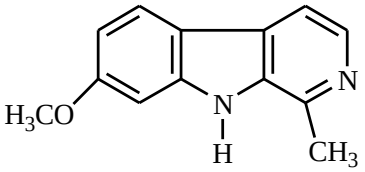
Наименования продукции: Стандартный образец гармина.

Основное назначение продукции: Стандартный образец гармина предназначен для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции:

Гармин 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо-[3,4-b]-индол

Химическая формула:



$C_{13}H_{12}N_2O$ М. м. 212

Описание: Гармин - кристаллический порошок цвета, без запаха. Содержание основного вещества не менее 98 %.

Растворимость: Гармин – растворим в спирте этиловом, метиловом и диметилформамиде.

Идентификация: Инфракрасный спектр образца, снятый в дисках с калия бромидом (3 мг образца и 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 $см^{-1}$ должен иметь полосы поглощения: 3420, 3142 (NH), 2964, 2832 (OCH3), 1627 (-C=N), 1565 и 1484, 1453.

Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора образца в 95% спирте этиловом в области от 210 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 241±2 нм, 301±2 нм.

Температура плавления: От 265 до 268 °С.

Элементный анализ гармина: найдено %: С 73,32; Н 5,81; N 13,16; вычислено %: С 73,57; Н 5,69; N 13,19.

Чистота гармина определяется методом ВЭЖХ на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в условиях описанных выше и составляет не менее 98 % . Время удерживания гармина: 12,6±1,0 мин.

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортировании и хранению.

Упаковка. По 100 мг во флаконы типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренные пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатые колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконы импортные.

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

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

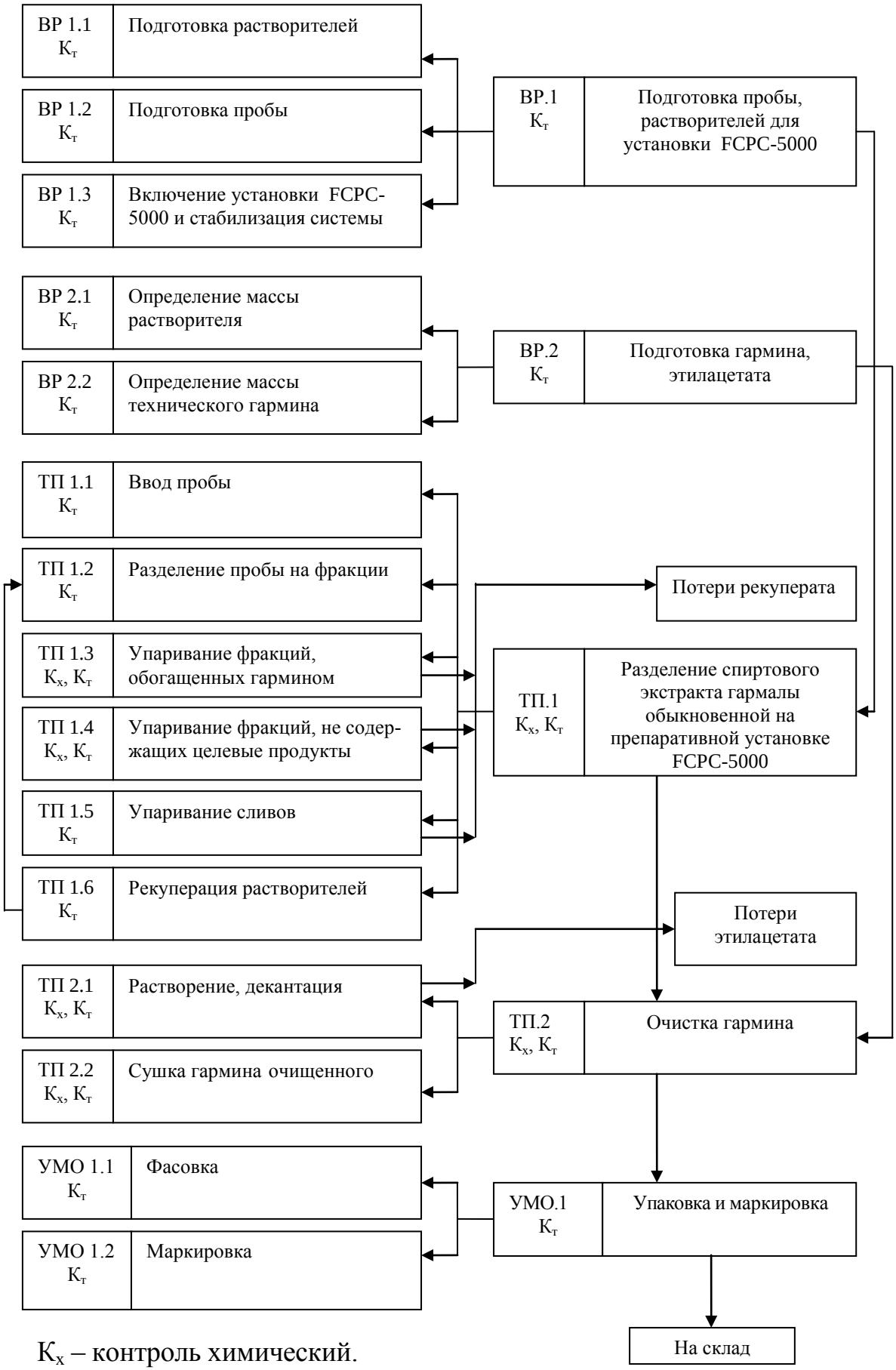
Хранение. В защищенном от света месте, при температуре от 2 ºС до 8 ºС.

Срок годности 1 год.

Химические превращения при получении стандартного образца гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения отсутствуют, поэтому химическая схема не приводится.

Основные стадии технологической схемы получения стандартного образца гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения на рисунке 25.

Аппаратурная схема получения стандартного образца гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения приведены на рисунке 26.



$К_х$ – контроль химический.
$К_т$ – контроль технологический.

Рисунок 25 – Технологическая схема получения гармина

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка растворителей, пробы для установки FCPC-5000

ВР 1.1 Подготовка растворителей

Для подготовки стационарной фазы (СФ) и подвижной фазы (ПФ) для хроматографического разделения на установке FCPC-5000 отмеряют мерным цилиндром 2,0 л этанола, 10,0 л этилацетата и 8,0 л воды очищенной, смешивают в делительной воронке объемом 25 л, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин и оставляют на 40 мин расслаиваться. Далее сливают нижний слой (подвижная фаза) 4,0 л и верхний слой (стационарная фаза) 6,5 л, передают на ВР 1.2, 1.3 и ТП 1. Операцию повторяют дважды.

ВР 1.2 Подготовка пробы

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г) 40,0 г (точная навеска) спиртового экстракта гармалы обыкновенной, затем количественно переносят в стеклянный стакан объемом 1,0 л и растворяют в 400 мл подвижной фазы и 400 мл стационарной фазы и передают на ТП 1.1.

ВР 1.3 Включение установки FCPC-5000 и стабилизация системы

Включают термостат ротора FCPC, компрессор, насос, детектор, контрольный модуль и компьютер установки FCPC-5000. Открывают программу Respoden (программа управления установки FCPC-5000) 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 мин со скоростью 100-300 мл/мин. По окончании заполнения коммуникаций вентиль направления потока переключают в рабочее положение.

Стационарная фаза закачивается в ротор при помощи насоса установки FCPC-5000 со скоростью 100 мл/мин при скорости вращения ротора 500 об/мин. Время заполнения/промывки ротора 50-60 мин.

После 5 разделений осуществляется смена стационарной фазы (промывка ротора) при аналогичных условиях.

Стабилизация системы установки FCPC-5000 проводится при подаче подвижной (мобильной) фазы в ротор с помощью насоса со скоростью 100 мл/мин, при скорости вращения ротора 1000 об/мин. Время стабилизации системы (уравновешивания ротора) 10-15 мин. После чего установка FCPC-5000 готова для хроматографического разделения (ТП 1).

ВР.2 - Подготовка гармина, этилацетата

ВР 2.1 Определение массы растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л этилацетата и передают на ТП 2.1.

ВР 2.2 Определение массы технического гармина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 30,0 г (точная навеска) гармина и передают на ТП 2.1.

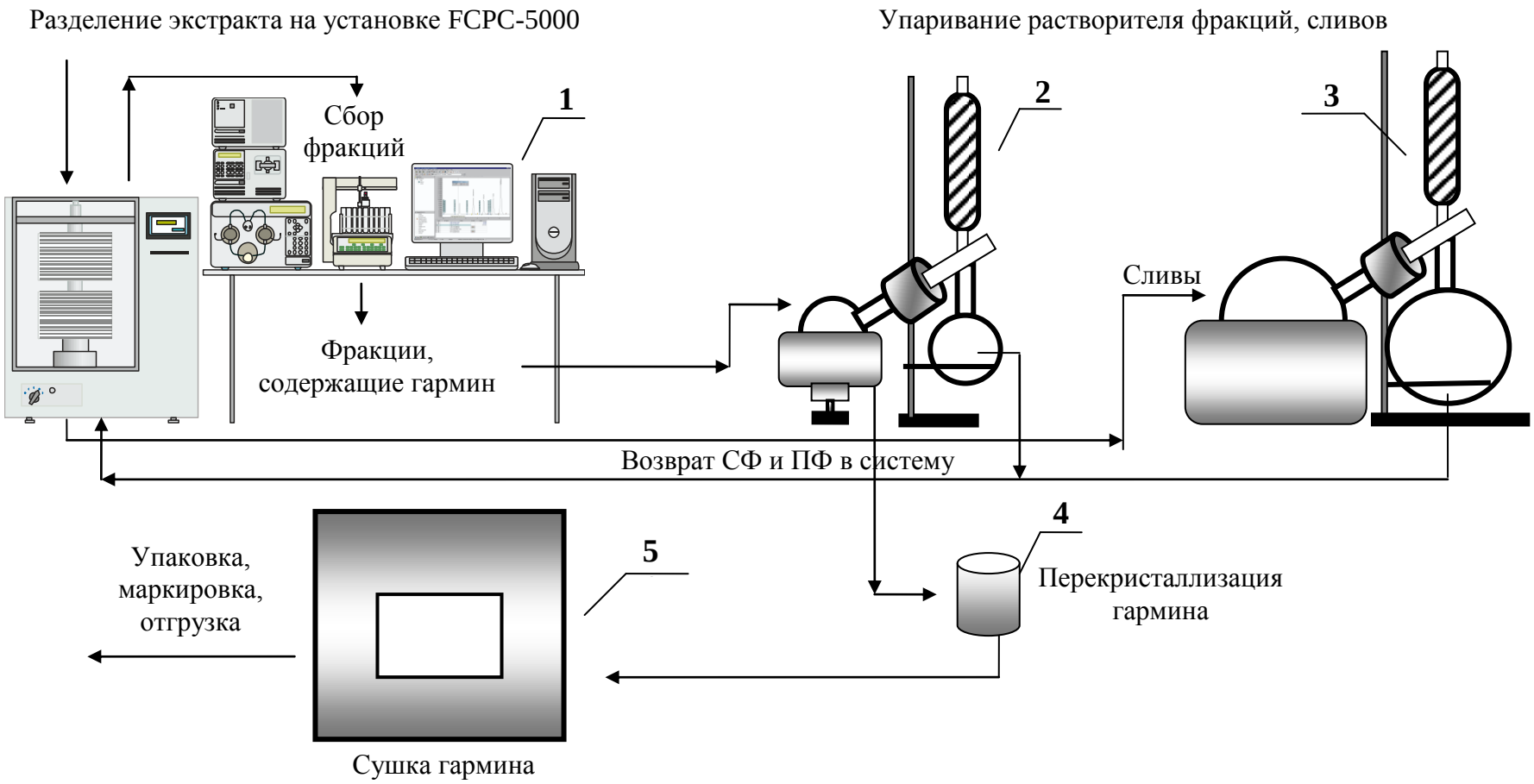


Рисунок 26 – Аппаратурная схема получения гармина

Стадии технологического процесса

ТП. 1 - Разделение спиртового экстракта гармалы обыкновенной на препаративной установке FCPC-5000

Активируют метод хроматографического разделения, который включает: 1) эквилибровку (5 минут со скоростью подачи мобильной фазы 10 мл/мин, запуск вращения и разгон ротора до скорости 1000 об/мин), 2) ввод пробы (8 минут со скоростью 100 мл/мин) и 3) разделение пробы на фракции (90 мин со скоростью подачи мобильной фазы 30 мл/мин, скорость вращения ротора 1000 об/мин).

ТП 1.1 Ввод пробы

Проба закачивается в ротор при помощи насоса установки FCPC-5000 со скоростью 100 мл/мин в течение 8 мин. Объем вводимой пробы 800 мл.

ТП 1.2 Разделение пробы на фракции

Разделение проводится при скорости подачи мобильной фазы 30 мл/мин и скорости вращения ротора 1000 об/мин, полное разделение вводимой пробы происходит в течение 1,5 ч. УФ-детектирование при 301 нм.

Отбор фракций проводят при помощи фракционного коллектора, переключением вентилей направления потока, согласно получаемой хроматограмме: при появлении первого пика (через 20-30 мин) переключают вентиль 1 и собирают первую фракцию. Далее проводят сбор фракций согласно полученной хроматограмме переключением вентилей 2-5 до окончания выхода пробы (показание детектора 0-2 AU). Таким образом, в результате разделения получают 5 фракций объемом от 100 до 1000 мл.

По окончании разделения скорость подачи мобильной фазы снижают до 10 мл/мин и выключают ротор, после его полной остановки отключают насос.

В день проводят 5 разделений.

Фракцию, содержащую гармин, передают на ТП 1.3.

Фракции, не содержащие целевой продукт, передают на ТП 1.4.

ТП 1.3 Упаривание фракций, обогащенных гармином

Фракцию, обогащенную гармином (фракции № 2), упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают на ТП 3.

ТП 1.4 Упаривание фракций, не содержащих целевые продукты

Фракции, не содержащие целевой продукт, упаривают на ротационном испарителе RV 05 basic или аналогичном и передают для анализа на наличие гармина. Качественный анализ фракций проводят методом ВЭЖХ в условиях описанных выше.

ТП 1.5 Упаривание сливов

Сливы стационарной и мобильной фазы упаривают на ротационном испарителе Pilot Vap-50 или аналогичном. Остаток передают для анализа на наличие гармина. Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы передают на ТП 4.6. Качественный анализ сухого остатка проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных выше.

ТП 1.6 Рекуперация растворителей

Полученные отгоны стационарной и мобильной фазы заливают в делительную воронку объемом 25 л, тщательно встряхивают в течение 5 мин и

отстаивают в течение 1 ч. Далее стационарную и мобильную фазы разделяют и передают на ТП 2.2.

Разделение 7,62 кг экстракта гармалы обыкновенной проводится в течение 73 дней.

ТП.2 - Очистка гармина

ТП 2.1 Растворение, декантация

Объединенные фракции технического гармина, содержащие балластные вещества обрабатывают этилацетатом (марки х.ч.). После растворения балластных веществ растворитель декантируют и в приемнике остается чистый гармин, в количестве 1,42 г, поступающий на ТП 3.2.

ТП 2.2 Сушка гармина очищенного

После очистки гармин 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 ^{0}С и давлении –0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы. Гармин должен иметь вид мелкого кристаллического порошка белого цвета без запаха.

Очистка технического гармина массой 1,42 кг и получение 1,00 кг гармина проводится в течение 38 дней.

Чистота и подлинность, полученного гармина очищенного, определяется методом ВЭЖХ в условиях описанных выше. Время удерживания гармина 12,7±1 мин. Чистота гармина очищенного должна составлять не менее 98,0 %.

Инфракрасный спектр образца, снятый в дисках с калия бромидом (3 мг образца и 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см$^{-1}$ должен иметь полосы поглощения: 3420, 3142 (NH), 2964, 2832 (OCH_3), 1627 (-C=N), 1565 и 1484, 1453.

Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора образца в 95% спирте этиловом в области от 210 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 241±2 нм, 301±2 нм.

Температура плавления. От 265 до 268 °С.

Элементный анализ гармина: найдено %: С 73,32; Н 5,81; N 13,16; вычислено %: С 73,57; Н 5,69; N 13,19.

Полученный сухой очищенный гармин передается на УМО.1.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции гармина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 100 мг во флаконы типа ФО-10-НС-3 по ТУ 64-2-10-87, укупоренные пробками из резиновой смеси марок И-51, 52-599/1 или ИР-119 по ТУ 38.006108-90 и обжатые колпачками алюминиевыми типа К-2-14 по ОСТ 64-009-86 или во флаконы импортные.

УМО 1.2 Маркировка

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

Проведена валидация производственного процесса получения стандартного образца гармина. В ходе получения валидационной серии отсутствовали отклонения от производственного регламента. В результате, установлено, что технологический процесс получения стандартного образца гармина стабилен и приводит к получению продукта требуемого качества. Основным фактором риска, который может повлиять на количественный выход продукта, является меньшее или большее содержание гармина в лекарственном ратительном сырье гармалы обыкновенной.

Таким образом, разработан и утвержден лабораторный регламент получения стандартного образца гармина (ЛР-40761819-08-14). По результатам валидация производственного процесса получения стандартного образца гармина установлено, что технологический процесс стабилен и приводит к получению продукта требуемого качества.

5 ВНЕДРЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРОССГЕМИНА, ЦИНАРОПИКРИНА И ГАРМИНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ОРИГИНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

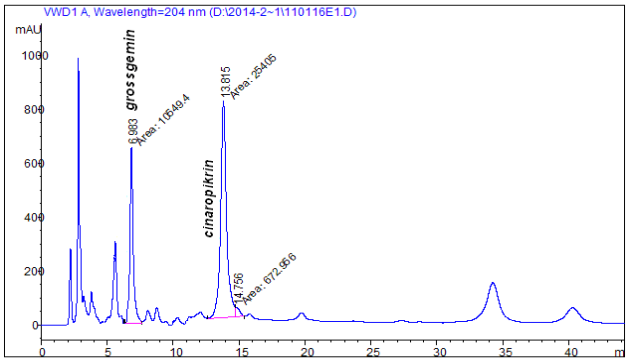
На базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия» организован выпуск стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина (Приложения Ж, И).

Национальные стандартные образцы ГФ РК гроссгемина, цинаропикрина и гармина внедрены в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для постадийного контроля производства и оценки качества лекарственных средств растительного происхождения: «Хартинол» противовирусного действия, «Саусалин» противопаразитарного действия и «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия, в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма. (Приложения К-М).

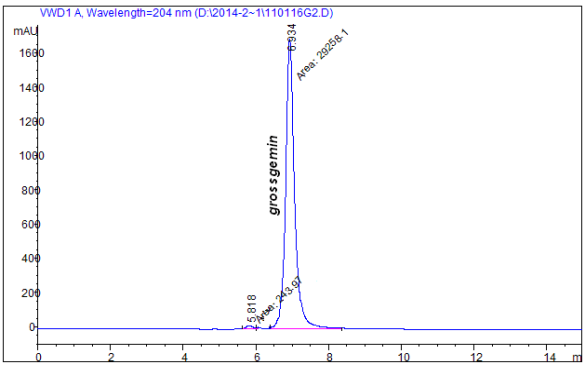
Гроссгемин применяется в качестве национального стандартного образца ГФ РК для поэтапного контроля качества фармацевтического производства противовирусного лекарственного средства «Хартинол»: контроль на входе – контроль качества сырья *Chartolepis intermedia* Boiss., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции гроссгемина, и контроль на выходе, то есть, качество субстанции гроссгемина (рисунок 27).

Так же стандартный образец гроссгемина применяется в качестве основной родственной примеси для контроля качества субстанции «Хартинол» и готовой лекарственной формы данного средства – порошка лиофилизированного (рисунок 28).

Цинаропкирин используется в качестве национального стандартного образца ГФ РК для контроля качества производства оригинального противопаразитарного средства «Саусалин», действующим началом которого является (рисунок 29).

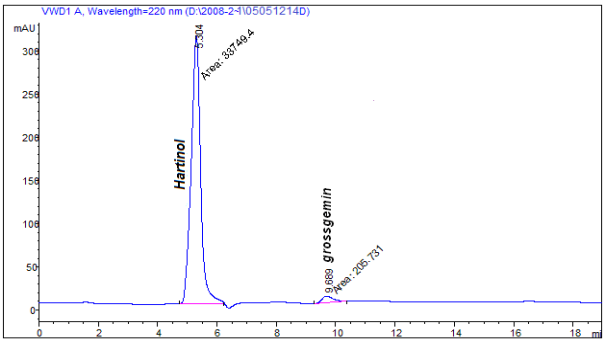


Хроматограмма количественного определения гроссгемина и цинаропикрина в сырье *Chartolepis intermedia* Boiss.

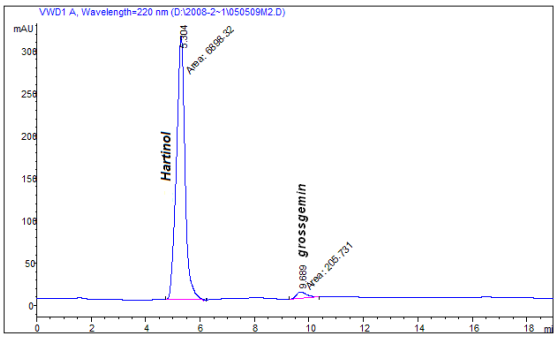


Хроматограмма количественного определения гроссгемина в субстанции гроссгемина

Рисунок 27 - ВЭЖХ хроматограммы количественного определения гроссгемина в сырье *Chartolepis intermedia* Boiss. и субстанции гроссгемина

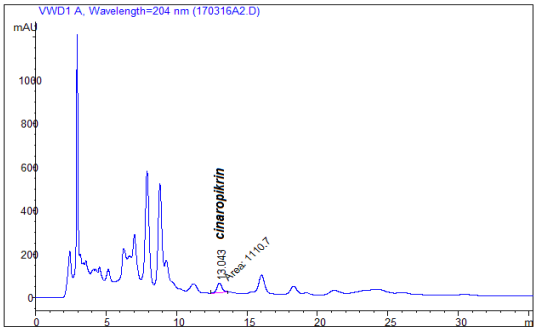


Хроматограмма количественного определения действующего вещества (98,2%) и гроссгемина (1,8%) в субстанции «Хартинол»

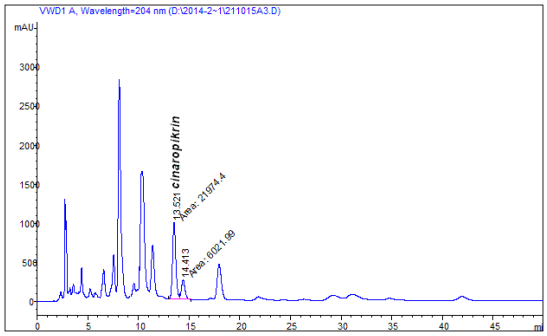


Хроматограмма количественного определения действующего вещества (98,5%) и гроссгемина (1,5%) в готовой лекарственной форме «Хартинол»

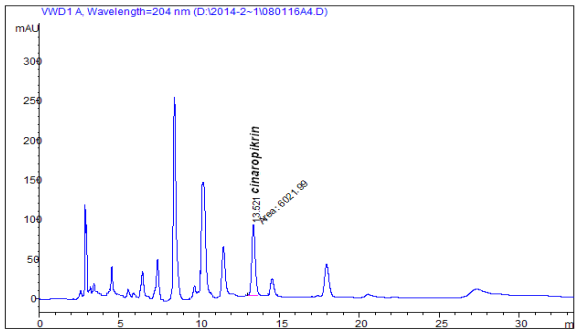
Рисунок 28 - ВЭЖХ хроматограммы количественного определения действующего вещества и гроссгемина в субстанции и готовой лекарственной форме «Хартинол»



Хроматограмма количественного определения цинаропикрина в сырье *Saussureae salsae* Pall.



Хроматограмма количественного определения цинаропикрина в субстанции - сухом экстракте *Saussureae salsae* Pall.



Хроматограмма количественного определения цинаропикрина в таблетках «Саусалин»

Рисунок 29 - ВЭЖХ хроматограммы количественного определения цинаропикрина в сырье *Saussureae salsae* Pall., сухом экстракте *Saussureae salsae* Pall. и таблетках «Саусалин»

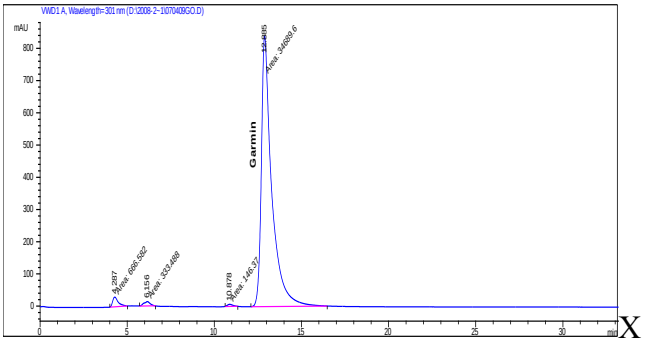
То есть контроль на входе - контроль качества растительного сырья *Saussureae salsae* Pall., промежуточный контроль - постадийный контроль производства субстанции сухого экстракта *Saussureae salsae* Pall. и готовой

лекарственной формы, так контроль на выходе - контроль качества субстанции саусалина и готовой лекарственной формы – таблеток «Саусалин».

Гармин применяется в качестве национального стандартного образца ГФ РК для поэтапного контроля качества фармацевтического производства лекарственного средства «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия: контроль на входе – контроль качества сырья *Peganum harmala* L., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции гармина, и контроль на выходе - качество субстанции гармина.

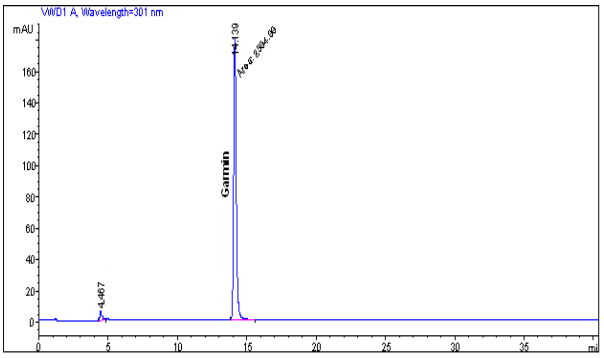
На рисунке 30 представлены хроматограммы количественного определения гармина в сырье *Peganum harmala* L. и в субстанции гармина.

Так же стандартный образец гармина используется в качестве основной родственной примеси для контроля качества субстанции «Гармина гидрохлорид» и готовой лекарственной формы данного средства – капсулах «Гармина гидрохлорид».



X

роматограмма количественного определения гармина в сырье *Peganum harmala* L.



Хроматограмма количественного определения гармина в субстанции гармина

Рисунок 30 - ВЭЖХ хроматограммы количественного определения гармина в сырье *Peganum harmala* L. и субстанции гармина

Таким образом, на базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия» организован выпуск стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина. Национальные стандартные образцы ГФ РК гроссгемина, цинаропикрина и гармина внедрены в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля производства и оценки качества лекарственных средств растительного происхождения: «Хартинол» противовирусного действия, «Саусалин» противопаразитарного действия и «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия, в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие **выводы**:

1 Проведена идентификация лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) по совокупности основополагающих факторов: внешних и микроскопических характеристик, качественного и количественного содержания биологически активных веществ гроссгемина, цинаропикрина и гармина, результатам товароведческого анализа, полученные данные включены в проекты АНД на лекарственное растительное сырье «Хартолепис средний трава» и «Гармала обыкновенная корни».

2 Разработан новый способ выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии; разработан новый способ выделения и очистки алкалоида гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения.

3 Разработаны технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, обеспечивающие стабильную наработку целевых продуктов в необходимом количестве и соответствующего качества.

4 Строение стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина однозначно установлены на основании ИК-, УФ-, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа. Описаны физико-химические и спектральные показатели стандартных образцов, которые будут использованы для идентификации и количественного определения гроссгемина, цинаропикрина и гармина в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

5 Разработаны проекты АНД на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина. Гроссгемин, цинаропикрин и гармин включены в Государственную фармакопею Республики Казахстан в качестве национальных стандартных образцов ГФ РК, которые предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

6 Разработаны и утверждены лабораторные регламенты на получение стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина. На базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия» организован выпуск стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина. Стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина внедрены в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля производства и оценки качества лекарственных средств растительного происхождения: «Хартинол» противовирусного действия, «Саусалин» противопаразитарного действия и «Гармина гидрохлорид» нейротропного действия, в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

Оценка полноты решения поставленных задач. Поставленные задачи по фармакогностическому изучению хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) и гармалы обыкновенной (P*eganum harmala* L.); разработке нового способа и технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина; исследованию физических и физико-химических показателей, регламентирующих идентификацию и качество полученных стандартных образцов; разработке нормативных документов на стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина и их внедрению, выполнены полностью.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов. Результаты, полученные в ходе проведенных исследований, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Разработаны новый способ, технологии и лабораторные регламенты получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, которые позволили на базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия» организован выпуск стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина. Гроссгемин, цинаропикрин и гармин включены в Государственную фармакопею Республики Казахстан в качестве национальных стандартных образцов ГФ РК, которые предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Национальные стандартные образцы ГФ РК гроссгемина, цинаропикрина и гармина внедрены в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма. Результаты данной диссертационной работы могут быть использованы в фармации, фармацевтической химии и технологии лекарств.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения. Полученные результаты имеют высокую технико-экономическую эффективность, поскольку, разработаны и внедрены новые технологии получения стандартных образцов гроссгемина, цинаропикрина и гармина, с применение современных хроматографичеких методов, которые характеризуются высокой производительностью, сравнительной автоматизацией и значительным сокращением продолжительности технологического процесса, исключением токсичных растворителей, что позволило существенно снизить себестоимость целевых продуктов. Включение в Государственную фармакопею Республики Казахстан гроссгемина, цинаропикрина и гармина в качестве национальных стандартных образцов ГФ РК, которые предназначены для идентификации и количественного определения в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах, позволяет осуществлять контроль качества производства отечественных оригинальных лекарственных средств по международным стандартам.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. По материалам диссертации

подана 1 заявка на патент РК, опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 1 статья в зарубежном научном издании, входящем в базы данных Thomson Reuters, Scopus, 1 статья в международном научном издании, входящем в базу данных Scopus, и тезисы 5 докладов в материалах международных конференций.

В целом, научно-методический уровень представленной диссертационной работы соответствует современным аналогам, опубликованным в открытой научной печати.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Леонтьев Д. Стандартные образцы – одно из важнейших звеньев обеспечения контроля качества лекарственных средств // Фармацевтическая отрасль. – 2012. - № 6 (35). - С. 84-86.

2 5.12. Стандартные образцы // Государственная фармакопея Украины / Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» – Первое изд. – Дополнение 3. – Харьков, 2009. – С. 79–88.

3 5.12. Reference standards // European Pharmacopoeia, 01/2008:51200.

4 2.2.N.2 Валидация аналитических методик и испытаний // Государственная фармакопея Украины / Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» – Первое изд. – Дополнение 2. – Харьков, 2008. – с. 85–67.

5 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. www.ich.org.

6 Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И. Обеспечение стран СНГ фармакопейными стандартными образцами // Фармацевтическая отрасль. - 2012. - № 2 (31). – С. 106-109.

7 British Pharmacopoeia (Br.Ph.) (2007).

8 Меркулов В.А., Саканян Е.И., Волкова Р.А., Климов В.И., Шемерянкина Т.Б., Яшкир В.А. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств // Хим.-фарм. журнал. - 2016. – Т. 50, № 4. – С. 40-43.

9 European Pharmacopoeia. 6 th Edition. – Strasbourg: Council oif Europe European (COE) – European Directorate for the Qiality of Medicines (2007).

10 The Pharmacopoeia of the United States of America. XXX. Rev. N.-Y. (2007).

11 Государственная фармакопея РФ. XII издание. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2007. – 704 с.

12 Государственная фармакопея РК. Т. 1. – Алматы: Жибек жолы, 2008. – 592 с.

13 Государственная фармакопея РК. Т. 2. – Алматы: Жибек жолы, 2009. – 804 с.

14 Леонтьев Д.А. Национальная система фармацевтических стандартных образцов лекарственных средств в Украине // Науковий журнал моз України. – 2013. - № 2 (3). - С. 108-114.

15 Адекенов С.М., Ивасенко С.А., Атажанова Г.А., Адекенова А.С., Тулеуова Г.Х. Аналитические стандартные образцы для лекарственного сырья, фармацевтических субстанции и готовых лекформ // Фармацевтический бюллетень. - 2012. - № 4-6. –С. 4-32.

16 Постановление Правительства «О Республиканском банке биологически активных соединений и Республиканском банке стандартных образцов лекарственных веществ и посторонних примесей» № 846 от 22.08.03 г.

17 Совместный приказ МЗ РК (№ 249 от 08.06.06 г.) и МОН РК (№ 250 от 26.06.06 г.) Правила учета, регистрации и хранения биологически активных веществ, полученных в Республике Казахстан».

18 Адекенов С.М. Сесквитерпеновые лактоны растений. Распространение в природе, особенности строения молекул и перспективы их применения // Матер. междунар. науч. конф.: «Терпеноиды: достижения и перспективы применения в области химии, технологии производства и медицины». – Караганда, 2008. - С. 39-62.

19 Адекенов С.М. Перспективы переработки растительного сырья республики и создание оригинальных лекарственных препаратов // Матер. VI Международного Беремжановского съезда по химии и химической технологии. - Караганда, 2008. - С.30-35.

20 Майофис Л.С. Химия и технология химико–фармацевтических препаратов. - М.: Наука, 1964. - С. 438-444.

21 Пат. 202468 СССР. Способ получения тауремизина / Рыбалко К.С., Баньковский А.И., Евстратова Р.И., Горелый В.А.; опубл. 14.09.1967. бюл. №19.

22 Пат. 6685972 US. Process for isolating artemisinin from *Artemisia annua* / Kumar Sushil, Gupta Shiv Kumar, Singh Digvijay, Gupta Madan Mohan, Jain Dharam Chand, Kahol Atul Prakash, Khanuja Suman Preet, Singh Ram Govind; опубл. 03.02.2004.

23 Пат. 1710062 SU. Способ получения сесквитерпеновых лактонов / Мир-Бабаев Н.Ф., Серкеров С.В.; опубл. 07.02.1992, бюл. №5.

24 Пат. 6479080 US. *Tanacetum parthenium* extract and method of obtaining same / Bomnardelli E., Morazzoni P.; опубл. 12.11.2002.

25 Пат. CN101190258 A. Total sesquiterpene lactone extract containing rich parthenolide and preparation method and application thereof / S. Zhang, G. Xiong; опубл. 4.06.2008 г.

26 Пат. CN102241684 A. Preparation method of parthenolide / Q. Zhang, S. Long, Y. Chen, J. Zhai, F. Zhang, H. Fan, W. Ma; опубл. 16.11.2011 г.

27 Fraga B.M. Natural sesquiterpenoids // Nat. Prod. Rep. – 2008. – Vol. 25. - P. 1180-1209.

28 Fraga B.M. Natural sesquiterpenoids // Nat. Prod. Rep. – 2009. – Vol. 26. - P. 1125-1155.

29 Fraga B.M. Natural sesquiterpenoids // Nat. Prod. Rep. – 2010. – Vol. 27. - P. 1681-1708.

30 Wen J., Shi H., Xu Zh., Chang H. Dimeric Guaianolides and Sesquiterpenoids from *Artemisia anomala* // J. Nat. Prod. - 2010. – Vol. 73. – P. 67–70.

31 Nie L.-Y., Qin J.-J., Huang Y., Yan L. Sesquiterpenoids from *Inula lineariifolia* Inhibit Nitric Oxide Production // J. Nat. Prod. - 2010. - Vol. 73. –P. 1117–1120.

32 Zhao Y.-M., Wang Y.-J., Dong M., Zhang M.-L., Huo Ch.-H. Two new eudesmanes from *Inula* // Химия природ.соедин. - 2010. - № 3. – С. 315-317.

33 Yang Y.-X., Shan L., Liu Q.-X., Shen Y.-H., Zhang J.-P., Ye J., Xu X.-K., Li H.-L., Zhang W.-D. Carpedilactones A–D, four new isomeric sesquiterpene

lactone dimers with potent cytotoxicity from *Carpesium faberi* // Org. Lett. – 2014. - Vol. 16, № 16. – P. 4216–4219.

34 Saroglou V., Karioti A., Rancic A., Dimas K. Sesquiterpene Lactones from *Anthemis melanolepis* and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. Prediction of Their Pharmacokinetic Profile // J. Nat. Prod. - 2010. – Vol. 73. – P.242–246.

35 Zhu Y., Hu P.-Zh. Sesquiterpene Lactones from *Scorzonera* // J. Nat. Prod. - 2010. - Vol. 73. – P. 237–241.

36 Pana L., Lantvit D.D., Riswan S. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes of *Rolandra ruticosa* // Phytochemistry. - 2010. – Vol. 71. – P. 635–640.

37 Leo M.D., Saltos M.B.V. Sesquiterpenes and diterpenes from *Ambrosia arborescens* // Phytochemistry. - 2010. – Vol. 71. – P. 804–809.

38 Huang H.-L. Eremophilane-type sesquiterpene lactones from *Ligularia hodgsonii* Hook // Phytochemistry. - 2011. - Vol. 72. – P. 514–517.

39 Buskuhl H. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity // Phytochemistry. - 2010. - Vol. 71. – P. 1539–1544.

40 Wu Z.-J. Ainsliadimer A. A New Sesquiterpene Lactone Dimer with an Unusual Carbon Skeleton from *Ainsliae amacrocephala*. // Org. Lett. – 2008. -Vol. 10, №12. - P. 2397–2400.

41 Yang M.C., Choi S.U., Choi W.S., Kim S.Y. Guaiane Sesquiterpene Lactones and Amino Acid-Sesquiterpene Lactone Conjugates from the Aerial Parts of *Saussurea pulchella* // J. Nat. Prod. – 2008. – Vol.71, № 4. - P. 678–683.

42 Kotsos M.P., Aligaiannis N., Myriaanthopoulos V. Sesquiterpene Lactones from *Staehelina fruticosa*. // J. Nat. Prod. – 2008. - Vol. 71, № 5. - P.847–851.

43 Aliyu A.B., Moodley B., Chenia H., Koorbanally N.A. Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Vernonia blumeoides* growing in Nigeria // Phytochemistry. - 2015. - Vol. 111. - P. 163-168.

44 Saito Yo., Ichihara M., Okamoto Ya., Gong X., Kuroda C., Tori M. Five new subspicatins and noreremophilane from *Parasenecio petasitoides* collected in China // Tetrahedron Letters. - 2011. – Vol. 52. - P. 6388–6391.

45 Wang F., Zhou D.-S., Wei G.-Z., Ren F.-C., Liu J.-K. Chlorantholides A–F, eudesmane-type sesquiterpene lactones from *Chloranthus elatior* // Phytochemistry. - 2012. – Vol. 77. - P. 312–317.

46 Qin J.-J., Zhu J.-X., Zeng Q., Cheng X.-R., Zhang S.-D., Jin H.-Z., Zhang W.-D. Sesquiterpene Lactones from *Inula hupehensis*. Inhibit Nitric Oxide Production in RAW264.7 Macrophages // Planta Med. - 2012. - Vol. 78. - P.1002–1009.

47 Zhang S.-D., Qin J.-J., Jin H.-Z., Yin Y.-H., Li H.-L., Yang X.-W., Li X., Shan L., Zhang W.-D. Sesquiterpenoids from *Inula racemosa* Hook. f. Inhibit Nitric Oxide Production // Planta Med. - 2012. - Vol. 78. - P. 166–171.

48 Wu Z.-J., Xu X.-K., Zeng H.-W., Shen Y.-H., Tian J.-M., Su J., Li H.-L., Shan L., Liu R.-H., Zhang W.-D. New sesquiterpenoids from *Ainsliaea macrocephala* and their nitric oxide inhibitory activity // Planta Med. - 2011. - Vol. 77. - P.1545–1550.

49 Venables L., Koekemoer T.C., Van de Venter M., Goosen E.D.

Isoalantolactone, a sesquiterpene lactone from *Artemisia afra* Jacq. ex Willd and its in vitro mechanism of induced cell death in HeLa cells // South African Journal of Botany. - 2016. – Vol. 103. - P. 216–221.

50 Popovicґ V., Heyerick A., Petrovicґ S., Calenbergh S.V., Karalicґ I., Niketicґ M., Deforce D. Sesquiterpene lactones from the extracts of two Balkan endemic *Laserpitium* species and their cytotoxic activity // Phytochem. – 2013. - Vol. 87. - P. 102–111.

51 Amoah S.K.S., de Oliveira F.L., da Cruz A.C.H., de Souza N.M., Campos F.R., Barison A., Biavatti M.W. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (*Chloranthaceae*) // Phytochem. - 2013. - Vol. 87. - P. 126–132.

52 Andolfi A., Zermane N., Cimmino A., Avolio F., Boari A., Vurro M., Evidente A. Inuloxins A–D, phytotoxic bi-and tri-cyclic sesquiterpene lactones produced by *Inula viscosa*: Potential for broomrapes and field dodder management // Phytochem. – 2013. - Vol. 86. - P. 112–120.

53 Liu J.-F., Wang Y.-F., Bi Y.-P., Li H.-J., Jia L., Bi Y.-F., Zhang Y.-B. Unusual nor-sesquiterpene lactone from the fruits of *Illicium henryi* // Tetrahedron Letters. - 2013. – Vol. 54, № 36. - P. 4834–4836.

54 Xiong Y., Qu W., Sun J., Wang M., Liang J. Eudesmane sesquiterpenoid lactones and abietane diterpenoids from *Ajuga forrestii* Diels. // Phytochemistry Letters. - 2013. - Vol. 6, № 3 - P. 457–460.

55 Solomon K.S. Amoah, Eirini Kouloura, Livia Macedo Dutrad, Andersson Barisond, Leticia M. Wildner, Maria L. Bazzo, Maria Halabalaki, Leandros A. Skaltsounis, Maique W. Biavatti Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense* // Phytochemistry Letters. - 2015. - Vol. 13. – P. 267–274.

56 Destandau E., Boukhris M.A., Zubrzycki S., Akssira M., Rhaffari L.E., Elfakira C. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillearadiata* // Journal of Chromatography B. – 2015. - Vol. 985. – P. 29–37.

57 Kitai Yu., Hayashi K., Otsuka M., Nishiwaki H., Senoo T., Ishii T., Sakane G., Sugiura M., Tamura H. New Sesquiterpene Lactone Dimer, Uvedafolin, Extracted from EightYacon Leaf Varieties (Small anthussonchifolius): Cytotoxicity in HeLa, HL-60, and Murine B16-F10 Melanoma Cell Lines // J. Agric. Food Chem. – 2015. - Vol. 63. - P. 10856−10861.

58 Gohari A.R., Mosaddegh M., Naghibi F., Eslami-Tehrani B., Pirani A., Hamzeloo-Moghadam M., Read R.W. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Inula aucheriana* // Annals of the Brazilian Academy of Sciences. - 2015. - Vol. 2, № 87. - P. 777-785.

59 Yang Y.-X., Shan L., Liu Q.-X., Shen Y.-H., Zhang J.-P., Ye J., Xu X.-K., Li H.-L., Zhang W.-D. Carpedilactones A−D, Four New Isomeric Sesquiterpene Lactone Dimers with Potent Cytotoxicity from Carpesium faberi // Organic letters. – 2014. - Vol. 16. – P. 4216−4219.

60 Venables L., Koekemoer T.C., Van de Venter M., Goosen E.D. Isoalantolactone, a sesquiterpene lactone from Artemisia afra Jacq. Ex Willd and its in vitro mechanism of induced cell death in HeLa cells // South African Journal of

Botany. - 2016. - Vol. 103. – P. 216–221.

61 Pinel B., Audo G., Mallet S., Lavault M., De La Poype F., Seraphin D., Richomme P. Multi-grams scale purification of xanthanolides from *Xanthium macrocarpum* centrifugal partition chromatography versus silica gel chromatography // Journal of Chromatography A. – 2007. - Vol. 1151. – P. 14–19.

62 Hankui W., Zhen S., Yi Y., Hang B., Akber A.H. Isolation of three sesquiterpene lactones from the roots of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. - 2007. - Vol. 1176, № 1-2. - P. 217-222.

63 Li A., Sun A., Liu R. Preparative isolation and purification of costunolide and dehydrocostuslactone from *Aucklandia lappa* Decne by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. - 2005. - Vol. 1076. - P. 193-197.

64 Ивасенко С.А. Жидкостная хроматография в анализе и технологии получения лекарственных препаратов. - Караганда: Гласир. - 2010. - 109 с.

65 Ivasenko S.A., Rakhimova B.B., Khabarov I.A., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. Use of fast centrifugal partition chromatography for isolation of sesquiterpene lactones // Матер. 8-th International symposium on the chemistry of natural compounds. - Eskisehir, 2009. - P. 88.

66 Хабаров И.А., Ивасенко С.А., Рахимова Б.Б., Итжанова Х.И., Адекенов С.М. Хроматографические методы в выделении и очистке арглабина из CO_2-экстракта полыни гладкой // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». - Пятигорск, 2010. - Вып. 65. - С. 417-418.

67 Khabarov I.A. Technological methods of isolation of sesquiterpene lactones from raw materials // Eurasian Chemico-Technological Journal. – 2009. - № 3. – С. 18-21.

68 Хабаров И.А. Получение и качество субстанции «Арглабин нативный» // Фармацевтический бюллетень. – 2010. - № 5-6. – С. 7-9.

69 Хабаров И.А., Ивасенко С.А., Рахимова Б.Б., Итжанова Х.И., Адекенов С.М. Разработка способа выделения арглабина из CO_2-экстракта полыни гладкой с применением центробежной хроматографии распределения // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». - Пятигорск, 2010. - С. 417-418.

70 Инновационный патент 23091 РК. Способ получения антиатеросклеротического и гиполипидемического средства «Атеролид» из полыни беловатой (*Artemisia leucodes* Shrenk.) / Адекенов С.М.; опубл. 20.09.2010 г, бюл. №11.

71 Фольмер В.В., Рахимова Б.Б., Ивасенко С.А., Адекенов С.М. Оптимизация условий извлечения сесквитерпенового лактона леукомизина из полыни беловатой // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». - Пятигорск, 2010. - Вып. 65. - С. 244-245.

72 Folmer V.V., Khabarov I.A., Ivasenko S.A., Rakhimova B.B., Zhabaeva A.N., Itzhanova K.I., Adekenov S.M. Optimization of method of isolation of

leucomisine from *Artemisia leucodes* Schrenk. // Матер. 2nd Annual Russian-Korean Conference «Current issues of natural products chemistry and biotechnology. - Novosibirsk, 2010. - P. 66.

73 Хабаров И.А. Получение и оценка качества субстанции «Леукомизин» // Фармация Казахстана. – 2010. - № 8. – С. 37-38.

74 Итоги исследования алкалоидоносных растений. Под ред. Арипова Х.Н. - Ташкент: ФАН, 1993. - 308 с.

75 Юнусов С.Ю. Алкалоиды. - Ташкент: ФАН, 1984. - 320 с.

76 Арипов Х.Н. О технологической классификации алкалоидов и способов их получения из растений // Химия природ. соедин. - 1977. - №6. - С. 743-753.

77 Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. - М.: ГЭОТАР-МЕДИЯ, 2009. - 375 с.

78 Ромашко С.Н., Молчан О.В., Юрин В.М. Разработка способов выделения алкалоидов индольного ряда из листьев *Catharanthus roseus* // Сборник научных трудов БГУ. - 2010. - Т. 4. - С. 1-9.

79 Патент РФ. «Способ получения сангвиритрина» / А.А. Савина, О.Н. Толкачев, О.Ф. Лаская, В.Н. Шейченко, А.А. Ананьева, Л.Ф. Либизова, И.Е. Копылова, В.С. Кабанов; опубл. 20.05.2011.

80 Ивахно С.Ю., Голованова Л.В., Станиловская Е.В., Кулешова Л.Н. Выделение алкалоидов из чистотела большого. Современные аспекты изучения лекарственных растений // Сборник научных трудов НИИФ. - 1995. - Т. 34. - С. 184-189.

81 Патент РФ. «Способ получения препаратов из растительного лекарственного сырья» / Н.А. Панкрушина, О.И. Ломовский, Э.Э. Шульц, Е.Ю. Винокурова, Г.А. Толстиков, В.В. Болдырев; опубл. 11.08.2011

82 Патент РФ. «Способ получения аллапинина» / А.А. Ананьева; опубл. 20.10.2004.

83 Сонкина Н.А., Сладкова В.В., Соколова Л.И., Гавриленко И.Г. Идентификация дитерпеновых алкалоидов *Aconitum kirinense* методами LC-MS и GC-MS // Тезисы докл. VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока». - 2004. - С. 154.

84 Молчанова А.И., Соколова Л.И., Горовой П.Г., Груздев В.Ю. Хинолизидиновые алкалоиды молодых побегов *Maackia amurensis* (Fabaceae) // Растительные ресурсы. - 2004. - Вып. 40, № 4. - С. 173-176.

85 Водяник А.Р., Шадрин А.Ю., Синев М.Ю. Сверхкритичесая флюидная экстракция природного сырья: мировой опыт и ситуация в России // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. - 2008. - №3(2). - С. 58-69.

86 Патент 47122 РФ. «Способ выделения алкалоидов» / Е.Ф. Форшунг, О.Х. Райнер, Р. Клаус, М. Винк; опубл. 20.10.2000.

87 Pereira C.G. Marcia O.M., Alaide S.B., Siani A.C., Fernandes E.C., Angela M., Meireles A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO_2+ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin // The Journal of Supercritical Fluids. - 2004. - Vol. 30. - P. 51-61.

88 Pereira C.G., Paulo T.V., Angela R.M., Meireles A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and

economical analysis // The Journal of Supercritical Fluids. - 2007. - Vol. 40. - P. 232-238.

89 Lopez C., Claude B., Morin Ph., Max J.P., Pena R., Ribet J.P. Synthesis and study of a molecularly imprinted polymer for the specific extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus extracts* // Analytica Chimica Acta. - 2011. - Vol. 683. - P. 198-205.

90 Zhou X.L., Chen Q.H., Wang F.P. New C_{19}-Diterpenoid Alkaloids from *Delphinium trifoliolatum* // Chem. Pharm. Bull. - 2004. - Vol. 52, № 4. - P. 381-383.

91 Zhou X.L., Chen Q.H., Wang F.P. Three New C_{19}-Diterpenoid Alkaloids from *Delphinium giraldii* // Journal of Asian Natural Products Research. - 2006. - №8(7). - P. 619-624.

92 Li Zh.B., Wang F.P. Two new diterpenoid alkaloids, beiwusines a and b, from *Aconitum kusnezoffii* // J. INPR. - 2008. - № 1. - P. 87-92.

93 Yuea H., Pi Z., Song F., Liu Z., Cai Z., Liu S. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSn // Talanta. - 2009. - Vol. 77. - P. 1800-1807.

94 Захаров В.П., Либизов Н.И., Асланов Х.А. Лекарственные вещества из растений и способы их производства. – Ташкент: «Фан», 1980. – 232 с.

95 Drapeau D., Blanch H.W., Wilke C.R. Liquid chromatographic isolation of vincristine and vinblastine // Journal of Chromatography. – 1987. - Vol. 390. – P. 297-306.

96 Карабаев Ш.Ш., Арипов Х.Н., Шакиров Т.Т. Выделение винкамина из *Vinca minor* // Химия природ. соедин. – 1972. – Т. 8, № 5. – С. 674.

97 Molyneux R.J., Gardner D.R., James L.F., Colegate S.M. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis // Journal of Chromatography A. – 2002. – Vol. 967, № 1. – P. 57.

98 Bakria M., Chen Q., Ma Q., Yang Y., Abdukadir A., Aisa H.A. Separation and purification of two new and two known alkaloids from leaves of Nitraria sibirica by pH-zone-refining counter-currentchromatography // Journal of Chromatography B. – 2015. - Vol. 1006. – P. 138–145.

99 Zhang Q.-P., Wang Z.-T., Chou G.-X. Preparative Separation of Four Alkaloids from Gelsemium elegans by High-speed Counter-current Chromatography // Chinese Herbal Medicines. – 2015. - Vol. 7(3). – P. 267-272.

100 Feng R.-H., Hou J.-J., Zhang Y.-B., Pan H.-Q., Yang W., Qi P., Yao S., Cai L.-Y., Yang M., Jiang B.-H, Liu X., Wu W.-Y., Guo D.-A. An efficient and target-oriented sample enrichment method for preparative separation of minor alkaloids by pH-zone-refiningcounter-current chromatography // Journal of Chromatography A. - 2015. - Vol. - P.138–145.

101 Damianakos H., Jeziorek M., Sykłowska-Baranek K., Buchwald W., Agnieszka P., Ioanna C. Pyrrolizidine alkaloids from Cynoglossum columnae Ten. (Boraginaceae) // Phytochemistry Letters. – 2016. - Vol. 15. – P. 234–237.

102 Iqbal N., Adhikari A., Kanwal N., Abdalla O.M., Mesaik M.A., Musharraf S.G. New immunomodulatory steroidal alkaloids from Sarcococa saligna // Phytochemistry Letters. – 2015. - Vol. 14. – P. 203–208.

103 Foucault A., Marchal L., Renault J.H., Intes O., Norrant E. Reduction of

solvent consumption and intensification of the injection in Centrifugal Partition Chromatography // Матер. GPE-EPIC 2nd International Congress on Green Process Engineering 2nd European Process Intensification Conference. - Venice, 2009. - P. 156.

104 Su Y.-P., Shen J., Xu Y., Zheng M., Yu C.-X. Preparative separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. using pH-zone-refining counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. - 2011. - Vol. 1218. – P. 3695–3698.

105 Niu L., Xie Zh., Cai T., Wu P., Xue P., Chen X., Wu Zh., Ito Y., Li F., Yang F. Preparative isolation of alkaloids from *Corydalis bungeana* Turcz. by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution // Journal of Separation Science. – 2011. – Vol. 34, № 9. – P. 987–994.

106 Duanmu Q., Li A., Sun A., Liu R., Li X. Semi-preparative high-speed counter-current chromatography separation of alkaloids from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. by pH-gradient elution // Journal of Separation Science. - 2010. – Vol. 33, № 12. – P. 1746–1751.

107 Wang X., Liu J., Geng Y., Wang D., Dong H., Zhang T. Preparative separation of alkaloids from *Nelumbo nucifera* Gaertn. by pH-zone-refining counter-current chromatography // Journal of Separation Science. – 2010. – Vol. 33, № 4-5. – P. 539–544.

108 Yu Q., Tong Sh., Yan J., Hong Ch., Zhai W., Li Y. Preparative separation of quaternary ammonium alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by pH-zone-refining counter-current chromatography // Journal of Separation Science. – 2011. –Vol. 34, № 3. – P. 278–285.

109 Zhang J., Jin Y., Liu Y., Xiao Y., Feng J., Xue X., Zhang X., Liang X. Purification of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang using preparative 2-D HPLC // Journal of Separation Science. – 2009. – Vol. 32, № 9. – P. 1401–1406.

110 Maurya A., Gupta Sh., Negi S., Srivastava S.K. pH-Zone-refining centrifugal partition chromatography for preparative isolation and purification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* // Journal of Separation Science. – 2009. – Vol. 32, №18. - P. 3126–3132

111 Feng R.-H., Hou J.-J., Zhang Y.-B., Pan H.-Q., Yang W., Qi P., Yao S., Cai L.-Y., Yang M., Jiang B.-H., Liu X., Wu W.-Y., Guo De-An. An efficient and target-oriented sample enrichment method for preparative separation of minor alkaloids by pH-zone-refining counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. – 2015. - Vol. 1409. – P. 159-165.

112 Xiao W., Yanling G., Fuwei L., Xingang Sh., Jianhua L.J. Large-scale separation of alkaloids from *Corydalis decumbens* by pH-zone-refining counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. – 2006. - Vol. 1115, № 1-2. – P. 267.

113 Maurya A., Gupta Sh., Negi S., Srivastava S.K. Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography // Journal of Chromatography B. – 2009. - Vol. 877. – P. 1732–1736

114 Renmin L., Xin Ch., Ailing S., Lingyi K. Preparative isolation and purification of alkaloids from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (Juss.)

Benth. by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. – 2005. - Vol. 1074. – P. 139-144.

115 Bourdat-Deschampsa M., Herrenknechta C., Akendengueb B., LaurensaA., Hocquemillera R. Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of *Enantia chlorantha* by centrifugal partition chromatography // Journal of Chromatography A. - 2004. – Vol. 1041, № 1–2. – P. 143–152.

116 Godecke A. Guanidine Alkaloids and Pictet-Spengler Adducts from *Black Cohosh* (*Cimicifuga racemosa*) // J. Nat. Prod. – 2009. - Vol. 72. – P. 433–437

117 Vieira M.N., Leitao S.G., Porto P.C.C., Oliveira D.R., Pinto S.C., Braz-Filho R., Leitao G.G. Application of pH-zone-refining countercurrent chromatography for the separation of indole alkaloids from *Aspidosperma rigidum* Rusby // Journal of Chromatography A. – 2013. – Vol. 1319. – P. 166–171.

118 Fanga L., Zhoua J., Lina Y.L., Wanga X., Suna Q., Li J.-L., Huang L. Large-scale separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* by pH-zone-refining counter-current chromatography with a new solvent system screening method // Journal of Chromatography A. – 2013. - Vol. 1307. – P. 80–85.

119 Yuan Zh., Xiao X., Li G. Dynamic pH junction high-speed counter-current chromatographycoupled with microwave-assisted extraction for online separation andpurification of alkaloids from *Stephania cepharantha* // Journal of Chromatography A. – 2013. - Vol. 1317. – P. 203– 210.

120 Адекенова А.С. Применение современных хроматографических методов для получения алкалоидов // Фармацевтический бюллетень. - 2014. - №3-4. – С. 140-152.

121 Отчет о научно-исследовательской работе по проекту грантового финансирования «Новые технологии получения фармакологически активных веществ из растительного сырья» на 2013-2015 гг. (№ гос. регистрации 0113РК00396).

122 Флора Казахстана. Под редакцией Н.В.Павлова - Алма-Ата: Наука, 1966. - Т. IX. – С. 375-376.

123 Торегожина Ж.Р., Ивасенко С.А., Адекенова А.С., Тулеуова Г.Х., Адекенов С.М. Стандартизация травы хартолеписа среднего // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Волгоград, 2013. - Вып. 68. – С. 109-110.

124 Адекенова А.С., Тулеуова Г.Х., Hohmann J., Адекенов С.М. Фармакогностическое изучение сырья *Chartolepis intermedia* Boiss. *и Peganum harmala* L. // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. - 2016. - № 2(314). - С. 200-204.

125 Флора Казахстана. Под редакцией Н.В. Павлова - Алма-Ата, 1963. - Т. VI. – С. 32-33.

126 Ивасенко С.А. Химическая модификация и биологическая активность сесквитерпеновых лактонов α-сантонина и гроссгемина: автореф. … канд. хим. наук: 02.00.10. – Караганда: Гласир, 2004. - 24 с.

127 Ji Young Lee, Mi-Ran Cha, Mi Ri Kim, Kwangho Lee, Sang-Un Choi, Shi Yong Ryu. Two nowel Guaiane Sesquiterpenes from whole plant of *Yongia japonica* // Planta Med Lett. – 2015. - № 2(01). - P. 31–34.

128 Yayli N., Baltaci C., Gok Y., Aydin E., ¨Ucunc O. Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss // Turkish Journal of Chemistry. – 2006. - Vol. 30, № 2. - P. 229-233.

129 Cravotto G., Nano G.M., Binello A., Spagliardi P., Seu G. Chemical and biological modification of cynaropicrin and grosheimin: a structure–bitterness relationship study // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2005. – Vol. 85. – P. 1757–1764.

130 Инновационный патент 23472 РК. «Метилиодид 13-диметиламино-3-оксо-8-гидрокси-1,5,7α,4,8,11β(H)-гвай-10(14)-ен-6,12-лида, обладающий антивирусным и иммуномодулирующим действием» / Адекенов С.М., Ивасенко С.А., Сейдахметова Р.Б., Ахметова С.Б., Атажанова Г.А.; опубл. 05.11.2010.

131 Yang M.C., Choi S.U., Choi W.S., Kim S.Y., Lee K.R. Guaiane Sesquiterpene Lactones and Amino Acid-Sesquiterpene Lactone Conjugates from the Aerial Parts of *Saussurea pulchella* // Journal of natural products. – 2008. - Vol. 71. - P. 678–683.

132 Инновационный патент 23374 РК. «Способ получения противотрихомонадного, противолямблиозного и противовоспалительного средства «Саусалин» из соссюреи солончаковой *Saussurea Salsa* (Pall.) Spreng.» / Адекенов С.М.; опубл. 15.12.2010.

133 Рыбалко К.С., Шейченко В.И. Строение гроссгемина – сесквитерпенового лактона из *Grossheimia macrocephala* (Muss.-Puschk.) D. Sosn. et Takht. // Журнал общей химии. – Т. XXXV. – С. 580-584.

134 Barbetti P., Fardella G., Chiappini I. New cytotoxic guaianolides and derivatives from *Grosheimia macrocephala* // II Farmaco-Ed. Sc. – 1985. - Vol. 40, № 10. - P. 755-769.

135 Ивасенко С.А. Изучение процесса экстракции при получении фармакологически активной субстанции на основе гроссгемина // Фармацевтический бюллетень. - 2010. - № 9-10. - С. 12-14.

136 Ивасенко С.А. Технология оригинальных лекарственных препаратов на основе природных сесквитерпеновых лактонов и их стандартизация: автореф. … докт. фарм. наук: 15.00.01; 15.00.02 – Караганда: «КарГУ им. Е.А. Букетова», 2010. - 42 с.

137 Adekenova A.S., Ivasenko S.A., Sakenova P.Y., Khabarov I.A., Tuleuova G.H., Adekenov S.M. Chromatographic methods to isolation and purification of reference samples grosheimin and cynaropicrin // Book of abstracts of the Internatioanl reserach and practice conference «Achivements and prospects for the development of phytochemistry». – Karaganda, 2015. - P. 182.

138 Adekenova A.S., Sakenova P.Y., Ivasenko S.A., Khabarov I.A., Adekenov S.M., Berthod A. Gram-Scale Purification of Two Sesquiterpene Lactones from *Chartolepsis Intermedia* Boiss. // Chromatographia. – 2016. – V. 79, № 1-2. – P. 37-43. (IF-1,411 Thomson Reuters)

139 С.М. Адекенов**,** К.А. Айтуганов, А.Д. Кагарлицкий**,** К.Д. Рахимов, С.М. Верменичев. Гроссгемин из Chartolepis intermedia и Centaurea ruthenica. Химико-фармацевтический журнал. – 1986. - № 8. – Р. 938-942.

140 Каминский И.А. Сесквитерпеновые лактоны Centaurea scabiosa L. Химическое исследование и разработка методов их анализа: автореф. …. канд. фарм. наук: 15.00.01 – 2011. - 22 с.

141 Samer Z., Holub M., Voràč K., Drożdż B., Jommi G., Gariboldi P., Corbella A. On terpenes. CCXIX. The structure of grosheimin. Collect. czechosl. chem. Commun. – 1972. - Vol. 37. - P. 2611-2629.

142 Фазылова А.С., Турдыбеков К.М. Влияние конформации семичленного цикла сесквитерпеноидов на спин-спиновое взаимодействие протонов лактонного цикла // Химический журнал Казахстана. – 2005. - № 3. – P. 230-236.

143 Отчет по научно-исследовательской работе «Разработка новых эффективных лекарственных препаратов из растительного сырья и организация их производства по международным стандартам GMP» на 2010-2012 годы (О.0530) № госрегистрации 0110РК00480.

144 Аскарова Д.А., Ивасенко С.А., Адекенова А.С., Тулеуова Г.Х., Адекенов С.М. Стандартизация гроссгемина – стандартного образца // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Волгоград, 2013. - Вып. 68. – С. 228.

145 Adekenova A.S. Reference Standards Based on the Grosheimin and Cynaropicrin // Eurasian Chemico-Technological Journal. – 2016. – Vol. 18. – P. 73-83. (IF-0,18 Scopus)

146 Драб А.И., Нурмухаметова Е.А., Пак Р.Н., Адекенов С.М. Противоописторхозное действие экстракта соссюреи солончаковой // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. - Т. 9, № 8. - С. 30-32.

147 Клюев Н.А., Бродский Е.С. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2002. - Т. XLVI, № 4. – С. 57-63.

148 Yayli N., Baltaci C., Gők Y., Aydin E., Űçűncű O. Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss. // Chemistry, Turk. J. Chem. – 2006. - № 30. – P. 229 – 233.

149 Адекенова А.С., Ивасенко С.А., Тулеуова Г.Х., Торегожина Ж.Р., Berthod A. Стандартизация цинаропикрина – стандартного образца // Матер. междунар. науч. конф. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск, 2014. – Вып. 69. – С. 184-186.

150 Patel1 K., Gadewar M., Tripathi R., Prasad S.K., Kumar P.D. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid “Harmine” // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2012. - P. 660-664.

151 Нурмаганбетов Ж.С. Нейротропные средства на основе природных алкалоидов и их производных // Фармацевтический бюллетень. - 2012. - № 2-3. - С. 15-32.

152 Корецкая Н.И. Алкалоиды *Peganum harmala* L. I. О выделении двух новых алкалоидов // ЖОХ. – 1957. – Т. 27. – С. 3361-3364.

153 Siddiqui S., Khan O.Y. Studies on the chemical constituents of the seeds of *Peganum harmala* L. isolation and structure of a new β-carboline alkaloid – harmalicine // Heterocycles. - Vol. 26, № 6. – P. 1563-1567.

154 Батсурэн Д., Тележенецкая М.В., Юнусов С.Ю., Балдан Т. Алкалоиды *Peganum nigellastrum* и *Peganum harmala* // Хим. природн. соедин. - 1980. - № 5. - С. 736- 737.

155 Адекенова А.С., Ивасенко С.А., Хабаров И.А., Сакенова П.Е., Нурмаганбетов Ж.С., Турмухамбетов А.Ж., Адекенов С.М. Применение центробежной хроматографии распределения для выделения гармина из гармалы обыкновенной // Матер. междунар. науч. конф. «Химия и фармакология растительных веществ». - Сыктывкар, 2014. – С. 7-9.

156 «Разработка нового фитопрепарата на основе алкалоида гармина, технология его получения по требованиям GMP, выпуск опытных партий субстанции» входящей в НТП 0.0431 «Разработка и организация производства оригинальных экспортоориентированных фитопрепаратов для развития фармацевтического кластера в Республике Казахстан на 2007-2009 годы» (№ госрегистрации 0107РК00324).

157 Maulik P.R., Basak B.S. // Cryst. Struct. Commun. – 1982. - V.19. - P.11.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДЕН
Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод»
_____Е.Г.Толоконников
«____» _____20__г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК
_____
«____» _____20__ г.

ПРИКАЗ
Комитет контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК
от «____» _____20__ г.
№_____

АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование образца

Grosgeminum – exemplar standartisatum

Гроссгемин – стандарттық үлгі

Гроссгемин – стандартный образец

МНН: ---

Наименование и страна организации-производителя

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АО «МНПХ «Фитохимия», Казахстан.

Наименование и страна организации-упаковщика

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АНД РК 42-

Вводится впервые

Срок введения установлен с
«____»_____ 20__ г.
Срок действия до
«____»_____20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ **ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА**

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

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 *Растворение* 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 суппозиториев 68
2.9.25. Испытание *Растворение* 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 *Растворение* 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 *Описание* 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 *Растворение* 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 гроссгемина;

– 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 цинаропикрина;

– 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 В

УТВЕРЖДЕН
Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод»
_____Е.Г.Толоконников
«____» _____20__г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК
_____
«____» _____20__ г.
М.П.

ПРИКАЗ
Комитет контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК
от «____» _____20__ г.
№_____
М.П.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование образца

Zinaropikrinum – exemplar standartisatum

Цинаропикрин – стандарттық үлгі

Цинаропикрин – стандартный образец

МНН: ---

Наименование и страна организации-производителя

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АО «МНПХ «Фитохимия», Казахстан.

Наименование и страна организации – упаковщика

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АНД РК 42-

Срок введения установлен с
«____»_____ 20__ г.

Вводится впервые

Срок действия до
«____»_____20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ **ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА**

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Для служебного пользования. Экз.№__

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
на получение стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина

ЛР-40761819-07-14
(обозначение регламента)

Срок действия регламента до «30» сентября 2017 г.

Караганда – 2014

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

УТВЕРЖДЕН
Директор ТОО «Карагандинский фармацевтический завод»
_____Е.Г.Толоконников
от «___» _____ 20___г.
М.П.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК
_____
«____» _____20__ г.

ПРИКАЗ
Комитет контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК
от «____» _____20__ г.
№_____

АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование образца

Harminum – exemplar standartisatum

Гармин – стандарттық үлгі

Гармин – стандартный образец

МНН: ----

Наименование и страна организации-производителя

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АО «МНПХ «Фитохимия», Казахстан.

Наименование и страна организации – упаковщика

ТОО «Карагандинский фармацевтический завод», Казахстан.

АНД РК 42-	Срок введения установлен с “_____”_____ 20 г.
Вводится впервые	Срок действия до “_____”_____ 20 г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ **ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА**

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Для служебного пользования. Экз.№__

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
на получение стандартного образца гармина

ЛР-40761819-08-14
(обозначение регламента)

Срок действия регламента до «30» сентября 2017 г.

Караганда - 2014

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

АКТ
внедрения научно-исследовательской работы
АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
(название учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина»
(название работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств»

Форма внедрения: Опытная технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии
(внедрение, метода, способа, аппарата и т.д.)

Ответственный за внедрение, исполнитель:
Сторона 1. Адекенова А.С. – докторант PhD КГМУ;
Сторона 2. Жабаева А.Н. – заведующая лабораторией технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия», к.фарм.н.

Эффективность внедрения: Разработана новая технология получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина из этилацетатного экстракта хартолеписа среднего с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эффективность разработанной технологии, при снижении трудозатрат в 2,0 раза, позволила снизить себестоимость целевых продуктов в 3 раза. Разработанная технология обладает рядом преимуществ: лучшая производительность, сравнительная автоматизация и уменьшение продолжительности процесса, отсутствие токсичных растворителей.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:
Внедрить технологию получения стандартных образцов гроссгемина и цинаропикрина с применением центробежной хроматографии распределения и высокоэффективной жидкостной хроматографии на базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия».

Сроки внедрения _____ 2018 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

АКТ
внедрения научно-исследовательской работы

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
(название учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Технология получения стандартного образца гармина»
(название работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинарогликрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств»

Форма внедрения: Опытная технология получения стандартного образца гармина с применением центробежной хроматографии распределения
(внедрение, метода, способа, аппарата и т.д.)

Ответственный за внедрение, исполнитель:
Сторона 1. Адекенова А.С. – докторант PhD КГМУ;
Сторона 2. Жабаева А.Н. – заведующая лабораторией технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия», к.фарм.н.

Эффективность внедрения: Разработана новая технология получения стандартного образца гармина из спиртового экстракта гармалы обыкновенной с применением центробежной хроматографии распределения. Эффективность разработанной технологии, при увеличении производительности в 6,5 раз и уменьшении трудозатрат, позволила снизить себестоимость целевого продукта в 5 раз. Разработанная технология обладает рядом преимуществ: лучшая производительность, сравнительная автоматизация и уменьшение продолжительности процесса.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:
Внедрить технологию получения стандартного образца гармина с применением центробежной хроматографии распределения на базе лаборатории технологии фитопрепаратов АО «МНПХ «Фитохимия».

Сроки внедрения _____ 2018 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

АКТ
внедрения научно-исследовательской работы
АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
(название учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Национальный стандартный образец ГФ РК гроссгемина»
(название работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств»

Форма внедрения: Национальный стандартный образец ГФ РК гроссгемина для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства противовирусного действия «Хартинол» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма
(внедрение, метода, способа, аппарата и т.д.)

Ответственный за внедрение, исполнитель:
Сторона 1. Адекенова А.С. – докторант PhD КГМУ;
Сторона 2. Тулеуова Г.Х. – заведующая лабораторией контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия», к.фарм.н.

Эффективность внедрения: Использование национального стандартного образца ГФ РК гроссгемина для поэтапного контроля качества фармацевтического производства противовирусного лекарственного средства «Хартинол»: контроль на входе – контроль качества сырья *Chartolepis intermedia* Boiss., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции гроссгемина и контроль на выходе, то есть, качество субстанции гроссгемина. Эффективность внедрения социальная и экономическая.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:
Внедрить Национальный стандартный образец ГФ РК гроссгемина в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства противовирусного действия «Хартинол» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

Срок внедрения _____ 2018 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атажанова
«____» _____ 2014 г.

АКТ
внедрения научно-исследовательской работы
АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
(название учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Национальный стандартный образец ГФ РК цинаропикрина»
(название работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств»

Форма внедрения: Национальный стандартный образец ГФ РК цинаропикрина для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства противопаразитарного действия «Саусалин» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма, для оценки качества лекарственного растительного сырья *Chartolepis intermedia* Boiss.
(внедрение, метода, способа, аппарата и т.д.)

Ответственный за внедрение, исполнитель:
Сторона 1. Адекенова А.С. – докторант PhD КГМУ;
Сторона 2. Тулеуова Г.Х. – заведующая лабораторией контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия», к.фарм.н.

Эффективность внедрения: Использование национального стандартного образца ГФ РК цинаропикрина для поэтапного контроля качества фармацевтического производства противопаразитарного лекарственного средства «Саусалин»: контроль на входе – контроль качества сырья *Saussureae salicae* Pall., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции - сухого экстракта *Saussureae salicae* Pall., и контроль на выходе - качество таблеток «Саусалин». Эффективность внедрения социальная и экономическая.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:
Внедрить Национальный стандартный образец ГФ РК цинаропикрина в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства противопаразитарного действия «Саусалин» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма, для оценки качества лекарственного растительного сырья *Chartolepis intermedia* Boiss.

Сроки внедрения _____ 2018 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ М

УТВЕРЖДАЮ
И.о.Председателя Правления
АО «МНПХ «Фитохимия»,
член-корр. НАН РК, д.х.н.,
профессор
_____ Г.А.Атаханова
«___» _____ 2014 г.

АКТ
внедрения научно-исследовательской работы

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
(название учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Национальный стандартный образец ГФ РК гармина»
(название работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Отечественные стандартные образцы грессгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств»

Форма внедрения: Национальный стандартный образец ГФ РК гармина для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства нейротропного действия «Гармина гидрохлорид» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма
(внедрение, метода, способа, аппарата и т.д.)

Ответственный за внедрение, исполнитель:
Сторона 1. Алекенова А.С. – докторант PhD КГМУ;
Сторона 2. Тулеуова Г.Х. – заведующая лабораторией контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия», к.фарм.н.

Эффективность внедрения: Использование национального стандартного образца ГФ РК гармина для поэтапного контроля качества фармацевтического производства нейротропного лекарственного средства «Гармина гидрохлорид»: контроль на входе – контроль качества сырья *Peganum harmala* L., промежуточный контроль – постадийный контроль производства субстанции гармина и контроль на выходе, то есть, качество субстанции гармина. Эффективность внедрения социальная и экономическая.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:
Внедрить Национальный стандартный образец ГФ РК гармина в лаборатории контрольно-аналитических работ и физических методов исследования АО «МНПХ «Фитохимия» для контроля производства и оценки качества растительного лекарственного средства нейротропного действия «Гармина гидрохлорид» в ряду сырье - субстанция - лекарственная форма.

Сроки внедрения _____ 2018 г.