ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СЛОВЕСНОВА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

КОМПЛЕКСНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА КОМПОЗИТНОЙ ТВЕРДОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ГИНКГО БИЛОБА

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук

Научный руководитель:
Петров Александр Юрьевич,
доктор фармацевтических наук, профессор

Екатеринбург, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ……..6

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ, ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) …….. 13

1.1. Современное состояние рынка средств с ноотропным и нейропротекторным действием 13

1.2. Особенности технологии получения таблетированных форм с сухими экстрактами лекарственного растительного сырья в форме сложных композитных таблеток 17

1.2.1. Применяемые технологии таблетирования 17

1.2.2. Подходы к созданию таблетированных форм на основе сухих экстрактов 20

1.2.3. Вспомогательные вещества, используемые в технологии таблетирования 24

1.3. Проблемы стандартизации поликомпонентных лекарственных форм 27

1.4. Современное состояние анализа компонентов разрабатываемого лекарственного препарата: экстракта гинкго и винпоцетина 27

1.4.1. Реакционная способность терпеновых трилактонов 29

1.4.2. Современное состояние анализа экстракта листьев гинкго двулопастного 31

1.4.3. Способы стандартизации винпоцетина 39

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 44

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ …… 46

2.1. Материалы исследования 46

2.2. Методики 47

2.2.1. Методики оценки фармакологической активности 48

2.2.2. Разработка составов и технологии таблеток 49

2.2.3. Методы стандартизации таблеточных масс, гранулятов и готовых таблеток 50

2.3. Обработка данных и их визуализация 52

2.4. Дизайн исследования 53

ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ 54

3.1. Выбор веществ, потенцирующих совместный эффект 56

3.2. Уточняющее исследование по выбору веществ 57

3.3. Оптимизация состава за счет подбора доз для сочетания винпоцетина с экстрактом гинкго 63

3.3.1. Угасание рефлекса пассивного избегания 64

3.3.2. Статическая работоспособность 69

3.3.3. Влияние на эмоционально-стрессовое состояние в тесте принудительного плавания 71

3.4. Исследования безопасности композиции: влияние сочетания на характеристики крови экспериментальных животных 74

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3 77

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОМПОЗИТНОГО ПРЕПАРАТА В ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ФОРМЕ НА ОСНОВЕ СМЕСИ ЭКСТРАКТА ГИНКГО И ВИНПОЦЕТИНА 79

4.1. Выбор технологии получения таблетированной формы, содержащей экстракт гинкго и винпоцетин 79

4.2. Проверка пригодности прямого прессования 80

4.2.1. Уточнение структуры винпоцетина в монокристалле методом рентгеноструктурного анализа (РСА) 82

4.3. Выбор вспомогательных веществ с использованием методов планирования эксперимента 83

4.4. Доработка состава вспомогательных веществ: наполнителя и связующего вещества 92

4.4.1. Оптимизация состава за счет вариации наполнителя 92

4.4.2. Выбор методики оценки степени высвобождения винпоцетина 95

4.4.3. Оптимизация соотношения наполнителя и связующего вещества 101

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4 107

ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ 108

5.1. Выбор и оптимизация методик для стандартизации готового лекарственного препарата 108

5.2. Проблемы стандартизации таблетированных форм с точки зрения оценки рисков возникновения и обнаружения несоответствий в процессе гражданского оборота 109

5.2.1. Ранжирование показателей, по которым были отозваны или изъяты лекарственные препараты 113

5.2.2. Взаимосвязь показателей при несоответствии по двум и более одновременно 115

5.2.3. Общие тенденции несоответствий 118

5.3. Стандартизация композиции на основе экстракта гинкго и винпоцетина 120

5.3.1. Выбор методики идентификации и количественного определения винпоцетина и компонентов экстракта листьев гинкго 120

5.3.2. Флуоресценция как метод анализа винпоцетина 121

5.3.3. Определение линейности флуоресценции винпоцетина 122

5.3.4. Разработка методики анализа терпеновых трилактонов с использованием предварительной дериватизации 124

5.4. Выбор условий количественного определения флавоноидов и винпоцетина методом ВЭЖХ-УФ 133

5.4.1. Оптимизация условий гидролиза флавоноидов экстракта листьев гинкго в присутствии винпоцетина 133

5.4.2. Разработка метода с использованием внутреннего стандарта 137

5.4.3. Разработка метода пробоподготовки 140

5.4.4. Валидация методики стандартизации препарата 142

5.4.5. Приемлемость внутреннего стандарта 146

5.5. Разработка спецификации на готовый продукт 147

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5 151

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 154

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 157

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Синтез флуоресцентных реагентов 181

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Изменение показателей теста «открытое поле» относительно исходного, проценты 183

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Титульный лист патента на изобретение № RU 2500415 C2 185

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Сравнение растворимости действующих ингредиентов в различных растворителях 186

ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Результаты рентгеноструктурного анализа 187

ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Технологическая схема производства таблеток винпоцетин с гинкго 10 + 64 мг 188

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. Титульный лист лабораторного регламента на производство таблеток композитного препарата «Экстракт гинкго и винпоцетин» 64+10 мг 189

ПРИЛОЖЕНИЕ И. Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебный процесс 190

ПРИЛОЖЕНИЕ К. Распределение доли несоответствий по одному и нескольким показателям в зависимости от показателя несоответствия, 2016 год 191

ПРИЛОЖЕНИЕ Л. Спектры по регистрации испускания при возбуждении при 365 нм в толуоле и в хлороформе 192

ПРИЛОЖЕНИЕ М. Условия для ацилирования терпеновых трилактонов 193

ПРИЛОЖЕНИЕ Н. Результаты определения сохранности действующих веществ в таблетированной форме до и после хранения 194

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время развитие научно-практической фармации протекает неоднородно: наибольший прогресс наблюдается в расширении ассортимента новых форм и поиске новых, оригинальных субстанций.

Готовые лекарственные формы доминируют в фармацевтической технологии, но развитие можно разделить на два ключевых направления: лекарственные формы, основанные на новых молекулах, и группы модернизированных лекарственных форм.

На фармацевтическом рынке России по-прежнему преобладают таблетки. Особенностью и одним из выраженных положительных качеств этой лекарственной формы является возможность их дополнительной оптимизации как в биофармацевтическом, так и в технологическо-экономическом плане. Поэтому таблетки являются наиболее перспективной и надёжной лекарственной формой выбора, в том числе и при проведении научных исследований.

В настоящее время продолжает расти интерес к лекарственным средствам, применяемых в терапии сосудистых и/или когнитивных нарушений. Это терапевтическое направление всегда было актуально из-за востребованности лечения и профилактики таких тяжелейших заболеваний, как инсульт (3,5 млн пациентов в год, 78,7 % из этих пациентов сталкиваются с когнитивными нарушениями). Ряд других нозологий также связан с когнитивными нарушениями и/или нарушениями циркуляции: так, часто когнитивные расстройства могут встречаться у различных возрастных категорий пациентов и требуют восстановления, которое обычно протекает медленно из-за хронического характера заболевания.

Поэтому вполне целесообразна и привлекательна поддерживающая комплексная терапия, и особенно полезно сочетание, включающее использование лекарственных средств природного происхождения. При этом наиболее надёжный вариант фармакотерапевтического воздействия – это комбинированный лекарственный препарат, что, несомненно, вызовет потенцирование

фармакологического эффекта, улучшит контроль над возможными нежелательными реакциями и незначительно повлияет на технологическо-экономические показатели разрабатываемой лекарственной формы.

В связи с этим была предложена композиция, составленная из двух компонентов: экстракта гинкго двулопастного и винпоцетина. Обоснованность использования этого состава, прежде всего, состоит в усилении его фармакологической активности по отношению к каждому отдельному компоненту.

Компоненты гинкго двулопастного обеспечивают улучшение микроциркуляции, обладают нейропротекторным и антиоксидантным эффектами, а винпоцетин избирательно расширяет сосуды головного мозга, улучшает микроциркуляцию, снижает вязкость крови. Сочетание этих компонентов целесообразно и эффективно, предполагает повышение эффективности разрабатываемой композитной лекарственной формы.

Таким образом, проведенные исследования актуальны, что подчёркивает значимость данного научного направления для науки и практики фармации, а также приведет к созданию технологически и фармакологически обоснованных объектов разработки.

Степень научной разработанности изучаемой проблемы

Лекарственная форма таблетки представлена разнообразно и постоянно развивается. Так, можно выделить пролонгированные формы, которые в последние годы рассматриваются систематически. В то же время акцентируются вопросы технологического совершенствования таблеток за счет как новых технологий, так и выбора и разработки вспомогательных веществ. Из отечественных работ можно отметить работы А. М. Шевченко [1, 2].

В качестве современных исследований по экстракту гинкго можно привести работы Е. В. Ковтун [3]. В качестве литературных сведений, посвящённых стандартизации, можно отметить работы группы Т. А. ван Бек [4]. И в то же время никаких определённых данных в отношении комбинированных лекарственных форм соответствующей направленности нет.

Цель исследования – фармацевтическая разработка комбинированной твёрдой лекарственной формы – таблеток, содержащих экстракт гинкго билоба и винпоцетин, их технологии, стандартизация и фармакологическое подтверждение.

Задачи исследования:

1. Собрать и проанализировать данные отечественных и зарубежных научных информационных источников в области разработки лекарственных средств на основе экстрактов лекарственных растений в таблетированной форме.

2. На основании экспериментальных исследований определить наиболее подходящее сочетание действующих веществ из средств, применяемых для терапии когнитивных нарушений как в монопрепаратах, так и в сочетаниях.

3. Разработать состав вспомогательных веществ и технологию получения таблетированной формы комбинированного препарата и подготовить лабораторный регламент.

4. Теоретически обосновать наиболее критические показатели качества таблетированных препаратов за счет анализа недоброкачественных серий препаратов, выпущенных в гражданский оборот в периоды с 2013 по 2016 г. и с 2019 по 2024 г.

5. Определить возможность применения различных физико-химических методов для стандартизации готового препарата и разработать методики контроля комбинированного лекарственного препарата.

Научная новизна исследования

Изучены современные подходы к созданию таблетированных форм на основе экстрактов лекарственных растений. Определены основные технологические приемы в разработке подобных таблеток: использование супердезинтегрантов и/или влажного гранулирования, введение и подбор наполнителей. Определены наиболее часто требующие корректировки в процессе разработки показатели: «Распадаемость» и/или «Растворение», «Количественное определение», «Однородность дозирования» и «Родственные примеси».

Разработана композитная лекарственная форма на основе винпоцетина и экстракта листьев гинкго двулопастного.

Показано положительное влияние сочетания экстракта гинкго с винпоцетином на поведенческую активность белых крыс и определено оптимальное соотношение ингредиентов. В результате проведенных исследований выявлена способность композиции экстракта гинкго и винпоцетина в дозе 1 мг/кг увеличивать статическую работоспособность у белых крыс. Комбинация экстракта гинкго с винпоцетином в дозах 5 и 25 мг/кг оказывала положительное воздействие на стрессоустойчивость животных.

С использованием математических методов планирования эксперимента разработана оптимальная технология получения таблеток смеси винпоцетина и экстракта листьев гинкго двулопастного. Определен оптимальный дезинтегрант (кросповидон) и смесь наполнителей (микрокристаллическая целлюлоза и гидроксипропилцеллюлоза с низкой степенью замещения, далее – МКЦ и ГПЦ соответственно) как наиболее подходящие для достижения требуемой степени высвобождения действующих веществ.

На основе анализа несоответствий по показателям качества таблетированных лекарственных форм, обнаруженных в периоды 2013–2016 гг. и 2019–2024 гг., выявлены наиболее важные для разработки показатели качества таблеток: «Количественное определение», «Распадаемость» и «Растворение».

С целью изучения возможности применения флуоресцентных методов анализа впервые изучена реакция дериватизации терпеновых трилактонов с гидразинами и аминами, включая флуоресцентные метки на основе пирена, выявлена неоднозначность взаимодействия гинкголидов, что огранивает возможность применения флуоресценции.

Разработана методика совместного определения винпоцетина и флавоноидов экстракта листьев гинкго двулопастного с применением внутреннего стандарта – дротаверина гидрохлорида.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

На основе фармакологических исследований разработан состав композитной лекарственной формы, практическая значимость подтверждена

патентом РФ на изобретение (патент РФ № RU 2500415 C2 Комбинированный лекарственный препарат, авторы Н. В. Словеснова, А. Ю. Петров).

Установлено соотношение МКЦ:ГПЦ 3:2, позволяющее получать таблеточные массы, содержащие экстракты ЛРС, обладающие требуемой сыпучестью, из которых возможно получение таблеток с характеристиками, удовлетворяющими требованиям ГФ, что может быть использовано при разработке лекарственных форм с экстрактами другого ЛРС. Разработана экспресс-методика для оценки степени высвобождения винпоцетина из композитных таблетированных форм, позволяющая адекватно оценить данный параметр в процессе проектирования состава (подбор соотношения и вида вспомогательных компонентов) лекарственного препарата.

Предложена методика количественного и качественного определения винпоцетина и флавоноидов гинкго при их совместном присутствии в лекарственном препарате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором, в том числе определен оптимальный для данного сочетания компонентов внутренний стандарт (дротаверина гидрохлорид).

Методология и методы исследования

Методология исследования таблетированной формы основана на результатах изучения данных научной литературы о степени изученности выбранного объекта. В работе использовали физико-химические (хроматографические, флуоресцентные) методы анализа, приемы органического синтеза. Качественный и количественный состав обосновывали с помощью фармакологических исследований на основе общепринятых методов. Модельные таблеточные смеси и таблетки использовали для определения фармацевтико-технологических показателей согласно Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания. Флуоресцентные методики разрабатывались на основании получения флуоресцентных реагентов (флуорофор – пирен), а также исследования флуоресцентных свойств винпоцетина. Методики стандартизации обосновывали оценкой показателей, несоответствие по которым чаще всего

приводило к отзывам, прекращениям или приостановкам обращения в периоды 2013–2016 гг. и 2019–2024 гг. Методики для показателей качества [однородность дозирования, количественное определение (винпоцетин, флавоноиды) и родственные примеси] разрабатывали на основе методик ВЭЖХ-УФ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Анализ современного состояния технологии и контроля качества таблетированных форм на основе экстрактов, в том числе гинкго билоба.

2. Результаты исследований по выбору действующих веществ и их соотношений на основании комплексной фармакологической оценки наиболее распространённых нейротропных действующих веществ.

3. Результаты технологических исследований по выбору состава вспомогательных веществ и технологии получения готовой лекарственной формы.

4. Результаты анализа наиболее распространенных несоответствий таблетированных форм, находящихся в гражданском обороте и влияющих на процесс фармацевтической разработки.

5. Результаты исследований химических свойств ингредиентов с целью использования флуоресцентных и/или хроматографических методов для стандартизации. Разработанные методики контроля качества готовой лекарственной формы, в том числе с внутренним стандартом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждена необходимым объемом экспериментального материала, применением современных методов исследования, методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и вытекают из полученных автором данных.

Основные результаты диссертационной работы были доложены на региональных межвузовских и международных конференциях: Втором Евразийском конгрессе с международным участием, посвященном 85-летию Уральского медицинского университета, 2015; I Международной

(71 Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», Екатеринбург, 2016; XIV ежегодной межвузовской межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы развития российской фармации – Ильинские чтения», Санкт-Петербург, 2025.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальностей 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1 и 2 паспорта специальности – Промышленная фармация и технология получения лекарств.

Личный вклад соискателя ученой степени в исследования

Основная часть исследований (фармакологические исследования, получение гранулятов, таблеточных масс и таблеток, синтез флуоресцентной метки, получение кристаллов винпоцетина, разработка и валидация методов ВЭЖХ-УФ) проведена лично автором, отдельные разделы при консультации с д. фарм. н. А. Ю. Петровым. Доля участия в объёме проведённой работы составляет не менее 90 %.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 6 работ в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ, 1 статья в журнале, входящем в базу Scopus, и 1 патент [5].

Структура и объём диссертации

Работа изложена на 194 страницах машинописного текста, содержит 45 таблиц и 46 рисунков. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвящённой методам и объектам исследования, трех глав экспериментальных исследований, заключения, списка цитируемой литературы, включающего 186 источников, в том числе 116 на иностранном языке, и 12 приложений.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ, ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Современное состояние рынка средств с ноотропным и нейропротекторным действием

Понятие ноотропных средств обсуждается как в научной, так и в научно-популярной литературе. В англоязычной литературе синонимом ноотропных средств считают cognitive enhancers – совокупность лекарственных средств для коррекции когнитивных нарушений, сопутствующая различным расстройствам (от Альцгеймера до инсульта). Наиболее близким синонимом могло быть определение «нейрометаболические стимуляторы».

При этом в ряде работ под ноотропами понимают вещества с отсутствующим механизмом [6]. А растительные экстракты и моновещества растительного и/или животного происхождения выделены в отдельную группу [7]. Очень часто при обсуждении в русскоязычной литературе данные группы объединяют под названиями ноотропы. При этом разделяя все вещества на две подгруппы: мнестические (доминирующий эффект связан с улучшением памяти) и нейропротекторы (смешанный тип с широким спектром действия) [8]. При этом в АТХ классификации ноотропные средства выделены в группу N06B (Психостимуляторы, средства, применяемые при синдроме дефицита внимания с гиперактивностью, и ноотропные препараты). К этой группе, например, относится винпоцетин (N06BX18), пирацетам (N06BX03) и фенибут (N06BX22). В то время как препараты, влияющие на память и часто используемые для лечения деменции выделены отдельно в группу N06D, такие как гинкго билоба листья (N06DX02).

Комбинированные препараты представлены в основном сочетанием двух малых молекул в одной форме. Так, согласно данным реестра лекарственных

средств, на конец 2025 года в группе ноотропы – 7 комбинированных МНН (Таблица 1).

Количество комбинированных лекарственный препаратов, относимых к группе ноотропов, возрастало с 2020 года. При этом, начиная с 2022 года, появился препарат, основанный на сочетании экстракта гинкго двулопастного и действующего вещества пикамилона.

Таблица 1 – Отслеживание изменений количества зарегистрированных МНН комбинированных препаратов с ноотропной активностью

МНН	**Количество актуальных регистрационных досье**					
	октябрь 2020	**октябрь 2021**	**октябрь 2022**	**октябрь 2023**	**октябрь 2024**	**октябрь 2025**
Бетагистин + Пирацетам	1	1	1	1	1	1
Винпоцетин + Пирацетам	2	2	2	2	3	3
Гинкго двулопастного листьев экстракт + Никотиноил-гамма-аминомасляная кислота	0	0	1	1	1	1
Мелатонин + Мемантин	0	0	0	1	1	1
Морфолиния тиазотат + Пирацетам	1	1	2	2	2	2
Морфолиний-метил-триазолил-тиоацетат + Пирацетам	1	1	1	1	0	0
Пирацетам + Циннаризин	5	6	7	7	8	8
Итого	10	11	14	15	16	16

Экстракт листьев гинкго двулопастного сухой (далее экстракт листьев гинкго) является самым продаваемым ноотропным средством растительного происхождения [9]. Хотя высушенные листья широко применяются в виде биологически активной добавки, современная официальная практика сосредоточилась на стандартизованном экстракте листьев гинкго, содержащем 24 % флавоноидов и 6 % терпеновых трилактонов [10]. Данный экстракт лежит в основе оригинального препарата «Танакан» и наиболее известных его дженериков «Билобил», «Мемоплант» и т. д. Также стандартизированный

экстракт используется для получения нескольких комбинированных средств в виде биологических добавок и нескольких ЛП.

Среди лекарственных препаратов на основе экстракта листьев гинкго в реестре на 2025 год выделено 15 монокомпонентных препаратов. Из этих 15 распределение по готовым формам следующее: 2 раствора для приема внутрь, 6 капсульных форм и 7 таблетированных. На протяжении 5 лет наблюдается устойчивый рост лекарственных препаратов на основе экстракта листьев гинкго. При этом возрастает доля таблетированных форм (с 20 до 26 %). Ряд препаратов обозначены как ангиопротекторные средства, так в 2022 году появляются новые комбинации: к экстракту добавлен гептаминол и троксерутин (Гинкор Форт, Прото-Венол) и сочетание экстракта листьев гинкго с никотиноил-гамма-аминомасляной кислотой (Пикамилон Гинкго, Таблица 2).

Т а б л и ц а 2 – Динамика зарегистрированных на территории РФ лекарственных препаратов, имеющих указание на МНН экстракт гинкго двулопастного

Лекарственные препараты	**Количество регистрационных удостоверений на ЛП**					
	2020	**2021**	**2022**	**2023**	**2024**	**2025**
ЛРС в фильтр-пакетах	0	0	0	1	1	1
Гинкго двулопастного листьев экстракт						
субстанция	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*
раствор	1	2	2	2	1	1
таблетки	3	3	5	5	5	5
капсулы	9	9	9	9	10	10
в т. ч. комбинированные						
Гинкго двулопастного листьев экстракт + Никотиноил-гамма-аминомасляная кислота	0	0	1	1	1	1
Гептаминол + Гинкго двулопастного листьев экстракт + Троксерутин	0	0	1	1	1	1
Итого ЛП	13	14	18	18	19	19

При анализе многокомпонентных препаратов (более 3 компонентов) на территории РФ зарегистрированы капсулы и сироп «Интеллан» [экстракт гинкго билоба 50 мг, экстракт центеллы азиатской (*Centella asiatica (L.) Urb.*) 500 мг, экстракт херпестис монниеры *(Bacopa monnieri (L.) Wettst.)* 125 мг, экстракт кориандра посевного *(Coriandrum sativum L.)* 200 мг, экстракт амомума шиловидного *(Amomum subulatum Roxb.)* 200 мг, экстракт эмблики лекарственной *(Phyllanthus emblica L., син. Emblica officinalis)* 400 мг]. Однако данный препарат применяется в качестве антиастенического средства. Ряд препаратов, ранее широко распространённых на территории РФ, были заменены аналогами отечественного производства. Например, среди поликомпонентных препаратов, не поставляемых на территорию РФ и не имеющих регистрационное удостоверение, можно упомянуть Витрум Гинкго.

Тренд на расширение ассортимента препаратов на основе экстракта гинкго двулопастного может быть ассоциирован с нарастающим количеством исследований фармакологических, физиологических и клинических эффектов экстракта листьев гинкго. У экстракта гинкго описаны следующие эффекты на животных и человеке: ноотропный [11], нейропротекторный [12], противовоспалительный [13], ангиопротективный [14], а также способность ингибировать фактор агрегации тромбоцитов [15]. Основным показанием для применения экстракта листьев гинкго остается улучшение когнитивных способностей у пациентов с деменцией. При этом ряд исследований показывает принципиальную сравнимость эффективности от длительной терапии экстрактом гинкго с длительной терапией ингибиторами холинэстераз [16, 17].

Таким образом, экстракт листьев гинкго активно включается в состав различных лекарственных препаратов. Преимущественной готовой лекарственной формой для лекарственных препаратов остаются твердые – капсулы и таблетки.

1.2. Особенности технологии получения таблетированных форм с сухими экстрактами лекарственного растительного сырья в форме сложных композитных таблеток

1.2.1. Применяемые технологии таблетирования

Таблетированные формы традиционно занимают лидирующую позицию среди твердых лекарственных форм в частности (72,1 % от всех готовых твердых форм реестра) и всех готовых лекарственных форм в общем (33,9 % от всех готовых форм). Также таблетки преобладают среди готовых лекарственных форм на основе переработанного лекарственного растительного сырья на рынке РФ [18].

Классификация таблеток весьма сложна и может быть проведена по различным признакам. Наиболее распространено деление по следующим признакам: наличие оболочки и тип высвобождения. Так, среди таблетированных форм 54,5 % имеют оболочку. Из них 90,3 % имеют пленочную оболочку. При этом немодифицированное высвобождение характерно для 92,2 % форм. Среди 7,8 % модифицированных преобладают кишечнорастворимые (46,2 %) и пролонгированные (45,1 %) формы. Более подробное рассмотрение классификации таблетированных форм с модифицированным высвобождением приведено в изучении таблеток метопролола [19].

Таким образом, таблетированные формы сохраняют лидирующие позиции среди твердых лекарственных форм. При этом до сих пор значительная доля рынка – таблетки без оболочки и без изменения высвобождения. В случае нанесения оболочки производители склоняются в сторону пленочной оболочки (более 90 % от всех видов оболочки).

Среди способов получения таблеток могут быть выделены консервативные (прямое прессование, гранулирование, компактирование) и новые (экструзия расплава, 3D печать). Однако по основной классификации обычно разделяют прямое прессование и гранулирование [20]. Описание современных подходов к гранулированию в одном из обзоров [21, 22] также отражает разносторонность подходов, что может быть отражено следующей схемой (Рисунок 1).

Среди указанных способов консервативной сухой грануляцией называют брикетирование и компактирование. Данные способы таблетирования подходят для нестабильных в растворах веществ, но могут ухудшить распадаемость из-за затруднения смачиваемости [23]. Влажное гранулирование – более распространенный метод. Гранулирование в псевдоожиженном слое стало распространено в исследованиях начиная с 2010 года. Новые подходы к влажному гранулированию встречаются редко. Есть работа по использованию гранулирования для получения гранулятов сухого экстракта из сбора листьев малины (*Rubus idaeus L.*), смородины (*Ribes nigrum L.)* травы лабазника (*Filipendula ulmaria Maxim.)* и листьев кипрея узколистного (*Chamerion angustifolium L.)* [24].



Рисунок 1 – Виды гранулирования с делением на современные и традиционные подходы [21, 22]

Технология готовых форм в последнее десятилетие стали применять 3D-печать готовых лекарственных форм (3D-printed drug products) [25–27]. Для труднорастворимых веществ с низкой проницаемостью и растворимостью (класс 4 по биофармацевтической классификации) рассматривают экструзию расплава, в том числе в виде разработанной системы Meltrex®, технология которой основана на методе горячего плавления смеси коповидона и сурфактанта [28].

Другое направление – использование микроэмульсий для труднорастворимых веществ [29]. Микроэмульгирование может повысить эффективность перорального введения. Реализовать это возможно за счет использования в качестве формы твердых липидных наночастиц (например, для форм левотироксина используют частицы с ПЭГ, повышающим солюбилизацию [30]). Также важность получения микрочастиц в таблетированной форме показана на примере препаратов флавоноидов (флебопротекторов): исследование показало значимость микронизированной фракции для повышения высвобождения флавоноидов [31].

Использование биофармацевтической классификационной системы, основанной на сочетании растворимости и биодоступности вещества, является очевидным выбором для малых молекул при упрощенном проведении оценки биоэквивалентности. Так, наиболее четкий алгоритм выбора можно найти в публикации [32]. Однако не все работы учитывают данную классификацию в процессе фармацевтической разработки.

Консервативные методы получения таблетированных форм все еще остаются в фокусе внимания. Так, для новой калиевой соли арабиногалактана использовали компактирование перед таблетированием или фасовкой в капсулы. В качестве наполнителя в этом случае использовали лактозу для прямого прессования (Ludipress®) в соотношении 1:1 к действующему веществу и 47 % от массы таблетки [33].

Для преодоления проблемы недостаточной растворимости компонентов описано применение натуральных глубоких эвтектических растворителей. Оптимальными были выбраны бутандиол и левулиновая кислота. При этом

авторы замечают, что высокая вязкость, скорее всего, потребует добавления воды в данный раствор [34].

Таким образом, несмотря на появление в публикациях современных способов таблетирования, фокус остается на наиболее применимых в практике прямом прессовании, влажном гранулировании, в том числе гранулировании в псевдоожиженном слое.

1.2.2. Подходы к созданию таблетированных форм на основе сухих экстрактов

Проблема таблетирования лекарственных препаратов, содержащих экстракты растений, раскрыта достаточно хорошо на примере экстрактов различных растений.

Экстракт может быть самостоятельной лекарственной формой. В ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты» рассматриваются как разновидность лекарственной формы. В данной ОФС приводится классификация экстрактов по консистенции: жидкие, густые и сухие. Сухими считаются экстракты с влажностью не более 5 % [35]. Среди достоинств сухих экстрактов выделяют удобство применения, устойчивость при хранении, возможность более точного дозирования и расширение ассортимента лекарственных форм [36]. Недостатком сухих экстрактов можно считать низкую сыпучесть, повышенное содержание пылевидной фракции, слеживаемость и гигроскопичность. Сухие экстракты легко отсыревают, утрачивают сыпучесть и подвергаются микробному обсеменению [37]. В ряде работ отмечают низкую насыпную плотность [38].

При этом таблетированная форма экстрактов занимает большую часть рынка лекарственных средств на основе экстрактов (33,5 % в стоимостном и 24,4 % в натуральном выражении) [39]. Для получения твердых лекарственных форм и ряда мягких форм мало подходят жидкие и густые экстракты [40].

Среди проблем технологии готовых форм, содержащих экстракты, можно выделить замедленные распадаемость и растворение таблеток, низкую сыпучесть экстрактов, способность к цементированию и слеживанию экстрактов.

Среди способов преодоления данной проблемы могут быть выделены два подхода: изменение технологии получения (часто влажное гранулирование) и добавление веществ, способствующих набуханию таблетки и ее дезинтеграции [40].

Несмотря на вышеуказанные проблемы, для некоторых экстрактов описаны удачные попытки оптимизации состава для прямого прессования. Так, для таблеток сухого экстракта листьев малины (содержание экстракта более 57 %) подошло прямое прессование при использовании лактозы моногидрата 28 % и картофельного крахмала 14 %. Распадаемость таблеток до покрытия оболочкой составила не более 10 минут [41]. В другой работе при получении комплексного актопротекторного средства, включавшего в себя экстракт сбора листьев малины и смородины, травы лабазника и кипрея также использовали лактозу и кукурузный крахмал. При доле экстракта 66 % и содержании вспомогательных веществ лактозы 12 %, картофельного крахмала 21 %, аэросила 1 % не удалось получить таблетки прямым прессованием. В этой же работе гранулят получали 2%-го раствором ПВП. Обращает на себя внимание низкая насыпная плотность гранулята [(0,485 ± 0,072) г/см^3] [37].

Так, неприемлемость прямого прессования вынуждает перейти к влажному гранулированию, например, при получении таблеток с экстрактом сабельника болотного (*Comarum palustre*) использовали наполнитель – лактозу (39,5 % от массы таблетки) и гранулирующая жидкость – воду. Авторы приводят сравнение гранулятов, полученных методом протирания и гранулированием в псевдоожиженном слое, описывая лучший фракционный состав и повышение однородности дозирования [42]. Описано применение влажного гранулирования для получения таблеток экстракта полыни цитварной (*Artemisia cina*). При этом в качестве наполнителя используют МКЦ 101 и лактозу моногидрат в соотношении 1:3. В этом же составе в качестве увлажнителя используют спирт этиловый 96 % [43].

В другой работе из-за удовлетворительных характеристик [сыпучесть (7,6 ± 0,3) г/с; насыпная масса до уплотнения 0,60 ± 0,02 г/см^3; насыпная масса

после уплотнения (0,74 ± 0,02) г/см^3] самого растительного экстракта лапчатки белой (*Potentilla alba L.*) использовали прямое прессование. Однако из-за недостаточной распадаемости таблеток было решено ввести дезинтегрант (5 % кроскармеллозы натрия) [43]. Похожая ситуация описана в работе [44]. Смешанный экстракт с высокой сыпучестью при прямом таблетировании приводил к снижению распадаемости и ослизнению таблеток. Преодолели данную проблему введением 1 % аэросила.

Также в работе по получению экстракта листьев лопуха войлочного (*Arctium tomentosum Mill.)* описывается экстракт с фракцией пыли не более 15 %, высокой сыпучестью (12,50 ± 0,60) г/с и высокой насыпной плотностью (0,66 ± 0,03) г/см^3. Однако способ получения включает измельчение экстракта, что приравнивает полученный спиртовой экстракт к готовому грануляту. Но даже в таком случае для прямого прессования потребовалось введение молочного сахара в соотношении 2:1 по отношению к экстракту [45].

Достаточно много публикаций посвящено получению гранулята до прессования. Так, опубликован патент по получению таблетированной формы экстракта пустырника (*Leonurus quinquelobatus Gilib.*), полученной гранулированием 10%-м раствором ПВП. При этом в качестве наполнителя используется смесь МКЦ и лактозы моногидрат 1:1,3 [46]. В другой работе описан процесс получения экстракта «Уролексан-Ф» и его таблетированной формы методом влажного гранулирования. Сам экстракт характеризуется низкой сыпучестью (0,60 г/с) и высокой влажностью для сухих экстрактов (10 %). Достоинством работы является сравнение нескольких наполнителей (МКЦ, ГПМЦ, сахароза и лактоза) в сочетании с картофельным крахмалом. Наилучшие результаты по распадаемости удалось получить на сочетании крахмал, МКЦ и экстракт 1:1:3 [47]. Похожие наполнители рассматривали при таблетировании смеси экстракта Живучки туркестанской (*Ajuga turkestanica (Regel) Briq.*) с аргинином и карнитином (соотношение ингредиентов 2:1:10 соответственно), обладающей невысокой сыпучестью (5,7 г/с). Рассматривали картофельный крахмал, кальция карбонат и дополнительное введение талька. Оптимальным

наполнителем была смесь сахарозы и МКЦ в соотношении 51:65, при доле наполнителя 22 % [48].

Влажное гранулирование было применено для смеси измельченного растительного сырья флаволигнанов расторопши (*Silybum marianum (L.) Gaertn.)* – силимарина. Достоинством работы является выбор связующих в разных количествах и разных концентрациях. Оптимальным, по мнению авторов, стал 5%-й раствор ПВП [49]. Также ПВП был признан оптимальным для гранулирования смеси сухих экстрактов бессмертника (*Helichrysum arenarium (L.) Moench.)* и расторопши (*Silybum marianum (L.) Gaertn.)* с порошком биомассы гриба фузариум бузиновый *(Fusarium sambucinum Fuckel).* При этом доля порошков растительного происхождения составила более 90 % [48].

Традиционной активной фармацевтической субстанцией гинкго, применяемой в медицине, остается сухой стандартизированный экстракт листьев гинкго двулопастного. Вместе с тем некоторые исследователи проверяют пригодность других методик экстрагирования других частей растения [50]. Также есть патент о дополнительной очистке экстракта за счет ионообменных смол [51].

Среди исследований есть работы по получению форм экстракта гинкго с использованием переносчиков. Например, опубликована разработка полимерных мицелл на основе хитозана для усиления нейропротекторного действия экстракта листьев гинкго. Продемонстрировано статистически значимое повышение выживаемости клеток при использовании наночастиц по сравнению с самим экстрактом [52]. Другой вариант – создание наноэмульсии на основе соевого лецитина с размером частиц 80–100 нм. В данной работе показано статистически значимое увеличение распределения гинкголида В в тканях [53]. В другой работе авторы делают вывод о повышении противобактериального эффекта смеси гинкголидов при получении твёрдых липидных наночастиц [54]. Как вариант переносчика в готовой форме может быть использован инкапсулированный сополимер полиэтиленгликоля (ПЭГ) и поликапролактона (ПКЛ) [55]. В другой работе подобных целей добиваются за счет получения нанокристаллов гинкголида В с гидроксипропилметилцеллюлозой [56].

Есть данные о таблетках с экстрактом гинкго (в статье называют гинкголидами) с замедленным (8–10 часов) высвобождением. Особенностью данной формы является получение ее с помощью 3D печати [57]. Рассматривают использование метода мокрого измельчения в бисерной мельнице для получения нанокристаллов и эмульсий с гинкголидом В, с использованием ПВП и соевого лецитина [58]. Несмотря на попытки применения различных инновационных форм, наиболее востребованной остаются таблетки и капсулы экстракта гинкго.

Таким образом, способ таблетирования сухих экстрактов растений во многом основан на свойствах конкретного экстракта. При этом основными проблемами является распадаемость готовых таблеток. Сыпучесть гранулятов и таблеточных масс может быть предиктором применения способа таблетирования. Среди способов получения таблетированных форм отмечают прямое прессование и влажное гранулирование как наиболее распространенные.

1.2.3. Вспомогательные вещества, используемые в технологии таблетирования

Получение таблетированной формы с соответствующими ГФ характеристиками невозможно без использования вспомогательных веществ. Среди вспомогательных веществ для получения таблетированных форм наиболее часто используют наполнители, разрыхлители (дезинтегранты) и связующие вещества (в случае введения дополнительной стадии уплотнения таблеточной массы). Свойствам вспомогательных веществ посвящено несколько обзоров, например, рассмотрено влияние наполнителей на биодоступность [59]. По отдельным классам вспомогательных веществ есть достаточно подробные обзоры. Так, хорошо систематизированы разрыхлители и дезинтегранты в обзорах [60, 61]. В публикациях раскрываются механизмы работы разрыхлителей, супердезинтегрантов. Рассмотрены оптимальные доли супердезинтегрантов, а также интересные подходы к их использованию: совмещение двух и более супердезинтегрантов, использование камедей. Эффективность натрия кроскармеллозы и натрия крахмалгликоголята на макетных таблетках МКЦ,

полученных путем прямого прессования, показана в работе [62]. В сравнении с ионообменными смолами, натриевые соли демонстрируют лучшую распадаемость.

В другой экспериментальной работе сравнивают в качестве одного из откликов при расчете обобщенной функции желательности дезинтегранты (кросповидон, натрия кроскармеллозу и натрия крахмалгликолят), при использовании в качестве наполнителя МКЦ, и выделяют повышенную эффективность для солей натрия по прессуемости и натрия крахмалгликолята по распадаемости. По функции желательности в качестве дезинтегранта оставляют кросповидон [63]. В аналогичной работе кроскармеллоза натрия или смесь гидрокарбоната натрия и лимонной кислоты обеспечивала высвобождение преднизолона (и отдельно преднизолона из оболочки), хотя и кросповидон не обеспечивал требуемого высвобождения [64].

Отдельно следует отметить использование β-циклодекстрина в качестве дезинтегранта для сильно гидрофобных АФС. Так, введение β-циклодекстрина в соотношении 1:1 к субстанции кандесартана цилексетила методом пасты с последующим влажным гранулированием позволило повысить распадаемость до целевых значений [65].

Исследования по выбору состава вспомогательных веществ для таблетированной формы фокусируются на нескольких проблемах: достижения сыпучести и прессуемости при прямом таблетировании [66], обеспечение требуемого вида кривой высвобождения действующего вещества [31, 67]. Ряд исследований рассматривает кривую высвобождения при введении таблетированной формы животным вместо кривой доступности в крови. К сожалению, в подобных работах не всегда приводится состав готовой формы [68, 69]. В другой работе приведен полный состав таблетки на основе малой молекулы с МКЦ в качестве наполнителя. При этом по разновидностям можно предположить получение формы прямым прессованием [70].

Обычное сочетание оцениваемых показателей можно сформулировать как сыпучесть и прессуемость для таблеточной массы и прочность, истираемость и распадаемость для таблеток [71].

Для действующих веществ на основе лекарственного растительного сырья используют разные вспомогательные вещества. Часто можно встретить упоминание большой доли наполнителя (от 30 % и более). Так, при разработке сорбента на основе жмыха яблок использовали 50 % лактозы (Lactopress® SprayDried) [72]. Иногда для монопрепаратов хорошо подходит сочетание МКЦ и лактозы [71]. Аналогичная смесь в качестве наполнителя описана для таблетированной вакцины холерной бивалентной, полученной методом влажного гранулирования. В качестве наполнителя используют смесь лактозы и МКЦ в соотношении 1:1. При этом соотношение относительно действующего вещества от 4 до 14 раз (к суммарной массе наполнителя) [73].

Влажное гранулирование с МКЦ марки 200 в качестве наполнителя описано для двухкомпонентной таблетированной формы рамиприла и леркандипина. В качестве связующего использована ГПЦ от 5 до 10 % [74].

Также описано использование хитозана в качестве матрикса для таблеток противохолерного иммуносорбента. Способ получения – влажное гранулирование, при котором дополнительно оценивалось давление прессования [75]. В одной из работ по получению таблетированной формы экстракта при использовании ГПЦ отмечают снижение размера гранулята за счет повышенной хрупкости [43].

При получении таблетированных форм экстрактов фокусируются на двух главных классах вспомогательных веществ: дезинтегрантах и наполнителях. Чаще всего из дезинтегрантов используют натрия кроскармеллозу и кросповидон. Отмечается положительное влияние на сыпучесть и в последующем на распадаемость МКЦ как без дополнений, так и в смесях с другими гидрофильными наполнителями.

1.3. Проблемы стандартизации поликомпонентных лекарственных форм

В ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты» приводят следующие показатели качества: «Описание», «Потеря в массе при высушивании», «Тяжелые металлы», «Остаточные органические растворители» и «Микробиологическая чистота» [35]. Упоминание возможности использовать экстракты в качестве фармацевтических субстанций в данной ОФС и смягчение требований ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения» вносит особенности в разработку показателей качества субстанций-экстрактов. Поэтому во многих публикациях уделяют особое внимание разработке методов контроля качества компонентов лекарственных препаратов растительного происхождения [76].

Среди способов стандартизации готовых таблетированных форм с двумя и более компонентами одной из основных проблем можно считать разработку методик количественного определения и анализ родственных примесей.

Для монокомпонентных таблеток на основе малых молекул методикой выбора часто является электронная спектроскопия поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях (далее УФ-спектроскопия). Так показаны высокие метрологические характеристики для определения фолиевой кислоты [77]. Среди подходов к количественному определению часто рассматривают метод второй производной для препаратов на основе смеси двух малых молекул [78].

1.4. Современное состояние анализа компонентов разрабатываемого лекарственного препарата: экстракта гинкго и винпоцетина

Гинкго двулопастное является архаичным растением, единственным представителем семейства *Ginkgoaceae*. Естественной средой обитания данного дерева считают провинцию Чжэцзян Китая. В странах Восточной Азии (Китае, Японии и Корее) семена данного растения традиционно употребляли в пищу,

а листья и семенной материал применяли в народной медицине. В Европе интродукция и культивирование *Ginkgo biloba* начались примерно с 1730 года. В официальную медицинскую практику препараты на основе стандартизированного экстракта листьев гинкго вошли во второй половине XX века. На протяжении последних десятилетий гинкго стал объектом многих исследований. За последние 20 лет было опубликовано 16 обзоров, посвященных проблемам анализа компонентов лекарственного растительного сырья китайской традиционной медицины, из которых 3 англоязычных и 1 русскоязычный обзор были посвящены непосредственно анализу гинкго [79–81]. Причина постоянного интереса к экстракту листьев данного дерева вызвана особенностями его химического состава. Основные соединения экстракта относятся к трем классам: флавоноиды, терпены и органические кислоты.

В листьях гинкго содержатся различные классы терпенов: монотерпены (эфиры линалона, р-цимол, тимол), сесквитерпены (билобалид, бисаболадиен-2,8-дион, билобанон, E-10,11-алантон, Z-10,11-алантон), трициклические дитерпены (гинкголиды).

Среди флавоноидов выделяют нарциссин, гинкгетин, изогинкгетин, никотифлорин, сиядопитизин, билобетин, аментофлавон, антоцианидин, рутин [82]. В более подробных исследованиях сырья и экстракта, полученных от произрастающих в Китае растений, описывается до 30 флавоноидов различных групп [83].

Вместе с тем основу экстрактов составляют два класса веществ: терпеновые трилактоны (уникальные соединения гинкго – гинкголиды и билобалид) и флавоноиды. Несмотря на различные описания множества флавоноидов, большая массовая доля приходится на традиционные гликозиды флавоноидов: гликозиды кверцетина, кемпферола и изорамнетина. На сочетании данных компонентов основано антиоксидантное действие листьев гинкго [84].

Уникальными и наиболее критическими для процесса стандартизации являются терпеновые трилактоны. Терпеновые трилактоны специфичны исключительно для гинкго и однозначно подтверждают подлинность [85]. Также

лактоны отвечают за ключевые терапевтические эффекты гинкго, которые невозможно достичь другими компонентами [86]. С точки зрения технологии эти соединения трудно экстрагировать в нужной пропорции, а также их концентрация сильно зависит от времени сбора листьев и метода очистки экстракта от нежелательных примесей [87].

1.4.1. Реакционная способность терпеновых трилактонов

На данный момент точное количество терпеновых трилактонов гинкго остается дискуссионным. Исторически первыми описали гинкголиды A, B и C [88]. Позже был описан гинкголид J, являющийся изомером гинкголида B. При этом четыре указанные гинкголиды, наравне с билобалидом, являются основными представителями терпеновых трилактонов гинкго. При их классификации опираются на величину углеродного скелета, выделяя билобалид (содержит 15 атомов углерода) и гинкголиды (содержат по 20 атомов углерода). В случае гинкголидов классификация основывается на наличии или отсутствии гидроксильной группы в положениях C1, 7 и 10 (Рисунок 2).

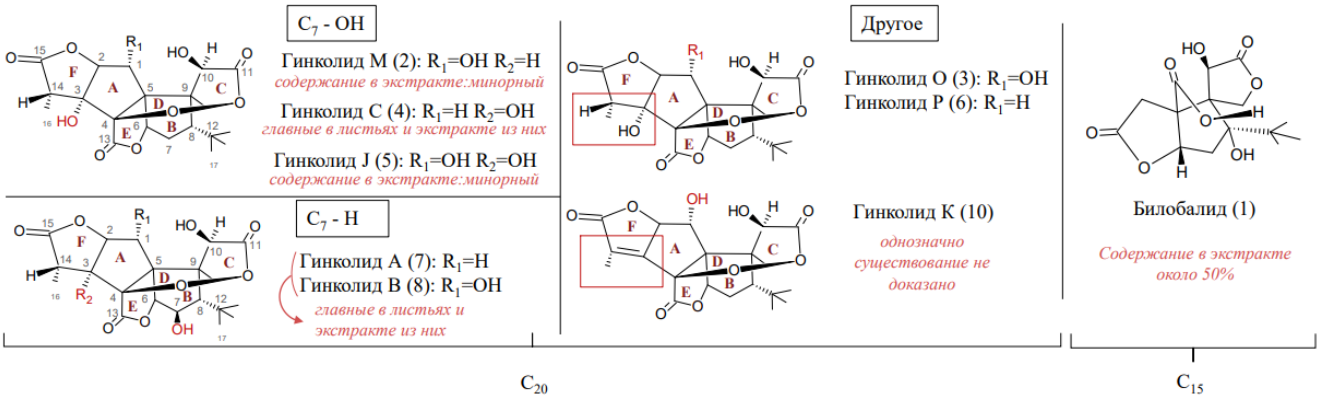


Рисунок 2 – Классификация терпеновых трилактонов гинкго двулопастного, описанных в литературе [89]

Соотношение терпеновых трилактонов примерно составляет 55, 13, 3, 11 и 17 % для билобалида, гинкголидов A, B, C и J соответственно [90]. По другим данным к главным гинкголидам также относят гинкголид M [89]. При этом

содержание гинкголидов приводят как 2,8–3,4 %, а билобалида (вместе с изомером) 2,6–3,2 % [89].

Вместе с тем однозначно не доказано существование гинкголида К. Особенностью этого соединения является кратная связь в кольце А, приводящая к отсутствию заместителя в положении 3. Свойства минорных гинкголидов описаны отдельно. Так подробно описана кристаллическая решетка гинкголида К [91].

Строение молекулы любого терпенового трилактона отличается от большинства лекарственных веществ – они представляют собой стерически затрудненное, изогнутое в виде розетки соединение. При визуализации посредством пакета Marvin наглядно демонстрирует степень стерической затруднённости (Рисунок 3).

Из-за высокой стерической затрудненности реакционная способность терпеновых трилактонов гинкго снижена. Результатом этого является небольшой круг описанных реакций данных соединений. Среди них алкилирование, ацилирование, гидролиз, окисление и восстановление.

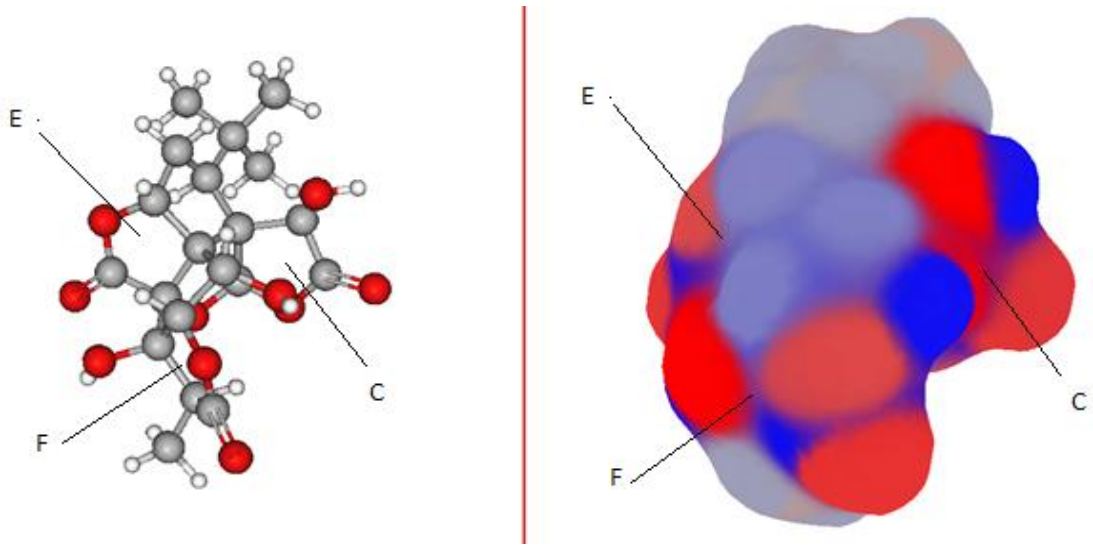


Рисунок 3 – Модель распределения заряда по молекуле гинкголида В (**GB**). Буквами обозначены соответствующие циклы. Построено пакетом Marvin [MarvinSuite, version 24.1, ChemAxon, Budapest, Hungary, 2024.
URL: chemaxon.com (accessed May 09, 2026)]

1.4.2. Современное состояние анализа экстракта листьев гинкго двулопастного

Несмотря на множество веществ в экстракте листьев гинкго, ключевыми являются флавоноиды и терпеновые трилактоны. Из-за высокой химической стабильности и отсутствия у ТТЛ поглощения в удобном для анализа диапазоне наиболее распространённой является методика стандартизации по сумме флавоноидов после гидролиза в пересчете на один или несколько агликонов. Встречаются работы как по пересчету на кверцетин, так и работы на основе интеграции сигналов трех основных агликонов – кверцетина, изорамнетина и кемпферола.

В результате для лекарственных средств на основе гинкго контроль сводится к определению трех агликонов, что обосновано со стороны фармакологии – отличие в действии данных веществ незначительно. Вместе с тем соотношение интенсивности сигналов агликонов может быть использовано для контроля возможной фальсификации путем добавления рутина (гликозид кверцетина), что предпочтительнее определения суммы флавоноидов УФ-спектрометрией.

На протяжении последних 20 лет вопрос о методе количественного определения гинкголидов в экстрактах активно обсуждается. Разработке и оптимизации способов количественного определения терпеновых трилактонов за этот период посвящено около сотни статей и опубликовано два больших обзора [92, 93]. В период с 2013 по 2018 год экстракт гинкго как объект стандартизации фигурировал во многих обзорных статьях [94].

Вместе с тем количественное определение экстракта гинкго требует нескольких усовершенствований для повышения эффективности. Количественный анализ преимущественно сосредоточен на ВЭЖХ с различными детекторами, однако встречаются работы и с другими методами анализа.

ГЖХ-МС. В фармакопее РФ экстракт гинкго стандартизуется по содержанию как флавоноидов, так и ТТЛ. При этом методом является ВЭЖХ-Р [95]. Согласно Европейской фармакопеи ранее основным методом

количественного определения терпеновых трилактонов был ГЖХ-МС после дериватизации силилированием [96].

В ранее рассмотренной публикации приведены метрологические данные на подобную методику (Таблица 3) [97]. Относительно флавоноидов авторам удалось добиться высокого значения линейности (от 0,991 до 0,998), однако это сопровождалось высокой ошибкой определения (сходимости), причем как междневной так и внутридневной.

ВЭЖХ-ELSD. Отдельно стоит рассмотреть применение детектора по испарению и рассеиванию света – ELSD. Данный способ регистрации показал очень высокие результаты для трилактонов, однако пока не нашел широкого распространения в практике.

Таблица 3 – Воспроизводимость результатов анализа терпеновых трилактонов согласно [97]

Вещество	**Количество, мг/мл**	**Междневная воспроизводимость СКО, %**	**Внутридневная воспроизводимость СКО, %**
Билобалид	5,52	1,21	3,30
	8,82	2,00	2,10
Гинкголид А	13,39	3,35	4,85
	18,18	4,00	5,26
Гинкголид В	5,41	3,14	3,68
	9,09	3,50	2,90
Гинкголид С	3,96	1,46	4,57
	9,09	2,30	4,20

После работ Т. А. ван Бек [98], показавших возможность использования ELSD-детектора для анализа терпеновых трилактонов, появился ряд публикаций, использующий модификацию данного метода. Так, ВЭЖХ-ELSD использовалось для оценки степени извлечения ТТЛ из растительного сырья [96]. Особенностью модификации является использование смеси метанола с водным

тетрагидрофураном в градиентном режиме. В данной работе представляют интерес приведенные метрологические характеристики: воспроизводимость и правильность, а также пределы идентификации, количественного определения и линейность (Таблицы 4 и 5).

Таблица 4 – Метрологические характеристики метода ВЭЖХ-ELSD: правильность и воспроизводимость

Вещества	**Воспроизводимость**		**Правильность, %**
	Внутридневная, СКО %	**Междневная, СКО %**	
Билобалид	3,12	2,43	96,45
Гинкголид А	3,14	2,94	95,20
Гинкголид В	2,94	3,31	98,06
Гинкголид С	3,60	2,88	94,80
Гинкголид J	2,95	2,81	96,13

Таблица 5 – Метрологические характеристики метода ВЭЖХ- ELSD: линейность и пределы анализа

Вещества	**Пределы идентификации, мг/мл**	**Предел количественного определения, мг/мл**	**Диапазон линейности мг/мл**	**R^2**
Билобалид	350	1155	500–8000	0,9898
Гинкголид А	250	825		0,9972
Гинкголид В	400	1320		0,9968
Гинкголид С	300	990		0,9942
Гинкголид J	250	825		0,9961

Есть работа по оптимизации методики определения терпеновых трилактонов методом ВЭЖХ-ELSD. Метрологические данные: линейность 0,99, правильность (100 ± 5,1) % и прецизионность – от 0,2 до 2,7 % [99].

Также использовали детектор ELSD при выявлении различий между популяциями деревьев в разных провинциях Китая [98]. Для разделения терпеновых трилакотонов использовали подвижную фазу вода : метанол 70:30. Определение флавоноидов (фактически их агликонов) проводили методом ВЭЖХ-УФ (длина волны детектора 360 нм). Для агликонов флавоноидов – 0,2%-й раствор фосфатов : ацетонитрил 55:45. Трудностью для воспроизведения может быть отсутствие указаний на вид используемого буфера (либо его pH).

Детектор по испарению и рассеиванию также использовался в анализе семян гинкго [99]. Достоинством этой работы является подробное описание работы детектора и подкрепление за счет данных тандемной масс-спектроскопии. Параллельно авторы проводили сравнение подвижных фаз на основе метанола и ацетонитрила, общий состав которых может быть представлен как вода – органический растворитель. В результате авторы остановились на градиентной системе, содержащей 0,5 % уксусной кислоты и смесь метанол – ацетонитрил. В результате изменений методики удалось добиться высокого показателя аппроксимации (0,9991), значений внутридневной (от 0,6 до 2,6 %) и междневной (от 0,2 до 2,7 %) сходимости.

ВЭЖХ-УФ. Применение метода ВЭЖХ-УФ для определения компонентов экстракта гинкго в плазме крови крыс описано Хуэй Чжу и др. [100]. Авторы использовали ВЭЖХ-УФ для определения суммарного содержания флавоноидов по трем главным агликонам. В результате сравнения различных условий гидролиза ими были выбраны температура 90 °C и продолжительность 2 часа. Используя подобные условия гидролиза, удалось добиться воспроизводимости порядка 95 % для кверцетина, и около 80 % для кемпферола. Вместе с тем работу отличает высокий коэффициент аппроксимации при исследовании линейности около 0,999.

Использование для стандартизации экстрактов гинкго по содержанию только флавоноидов отражено в ряде статей. Так, в работе [101] этот подход наравне с антибактериальной активностью – критерии оценки качества экстракции разными методиками. Для определения агликонов используют метод

ВЭЖХ-УФ, условия разделения: подвижная фаза «0,05%-я фосфорная кислота – метанол (50:50)», длина волны детектирования 360 нм. Остались непонятными условия гидролиза флавоноидов перед анализом. Элементы валидации, как и фрагменты метрологических характеристик, в статье не приводятся.

При установлении подлинности как листьев гинкго, так и продуктов на их основе возникает проблема фальсификации. Для нестандартного решения ее в одной из статей использовали метод главных компонент [102]: путем построения модели на опытной партии и дальнейшей ее проверки определяли суммарное содержание флавоноидов без предварительного гидролиза. Использовали метод ВЭЖХ-УФ как основной. Далее для идентификации пиков на хроматограмме иногда задействовали ВЭЖХ-МС. Из-за отсутствия валидации методики невозможно оценить метрологические характеристики этого подхода.

Другие авторы видят решение в модификации ныне существующих фармакопейных монографий [103]. Одной из таких модификаций может быть определение свободных агликонов без гидролиза. В нормальных условиях листья гинкго не содержат свободных агликонов. Следовательно, их появление свидетельствует о фальсификации или нарушениях условий хранения. Те же авторы указывают на другой подобный компонент – генистерин. Однако любой из методов обнаружит смешивание экстракта гинкго с рутозидом – самым дешевым и наиболее вероятным веществом для фальсификации.

Многие авторы останавливаются на определении только агликонов флавоноидов. Так поступили исследователи в работе по получению пеллет с замедленным высвобождением [104]. Высвобождение оценивалось методикой ВЭЖХ-УФ, при 368 нм (отличие от более распространенной 360 нм) и использованием подвижной фазы на основе метанола, ацетонитрила и раствора фосфорной кислоты в соотношении 55:40:5. В качестве основы пеллет используется смеси МКЦ и ПВП марки К-30 в соотношении 9:1, связующее вещество – вода.

ВЭЖХ-МС. Ряд работ посвящен использованию ВЭЖХ-МС для идентификации и количественного определения флавоноидов. Работы

по идентификации сфокусированы на расширении состава путем доказательства присутствия бифлавонов – достаточно специфичных для гинкго веществ класса флавоноидов [105].

Приводятся данные об анализе комбинированного препарата китайской медицины, состоящего из экстракта листьев гинкго и тетраметилпиразина. В качестве метода анализа выбрана ультра-ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометром в качестве детектора. При этом содержание флавоноидов отслеживается исключительно в пересчете на рутозидов. Метод рассчитан на анализ плазмы крови крыс после внутривенного введения веществ. В качестве внутреннего стандарта выбран нарингин. Метрологические данные: линейность – 0,99, прецизионность внутридневная – 5,59 %, междневная – 7,17 % [106].

В исследовании Ванга и др. рассматривается использование УВЭЖХ-МС для определения одного из гинкголидов (гинкголида L) в плазме крови и тканях крыс [107]. Авторы вводили выделенный гинкголид внутривенно в различных дозах. Интересно использование внутреннего стандарта (диазепама). Хроматографическая система – градиентная, с использованием метанола и 0,5%-го раствора муравьиной кислоты. Детекцию проводили в положительном режиме, что не типично для подобных соединений. Предварительно проводили валидацию метода: получили высокую линейность (от 0,996 до 0,999) и большие колебания точности (от 2 до 11 % СКО).

Использование внутреннего стандарта упоминается также в другой работе при анализе терпеновых трилактонов (внутренний стандарт – бензоилхлорид) [108].

ВЭЖХ с другими детекторами. Небольшое количество работ связано с использованием индивидуально модификаций методики ВЭЖХ. Для исследований свойств веществ удобно использовать сочетание универсальности УФ- или рефрактометрического детектора с другим недеструктивным. Такое сочетание свойств позволяет использовать несколько последовательных детекторов или дополнительный химический метод. Подобное исследование

проводили с целью установления антиоксидантной активности отдельных флавоноидов из листьев гинкго. Авторы использовали сочетание ВЭЖХ-УФ с последующим хемилюминесцентным анализом в режиме реального времени. Анализ флавоноидов проводился без предварительного гидролиза, с использованием градиентного режима ацетонитрила с 0,1%-м раствором фосфорной кислоты [100].

Другие методы анализа. Суперкритическая жидкостная хроматография (далее СУЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ) были применены только в нескольких публикациях. Примером первого направления является работа Си Фенг, посвященная использованию сверхкритической жидкостной хроматографии для получения экстракта с улучшенной биодоступностью [109].

Хотя метод ТСХ и является фармакопейным для экстракта гинкго в некоторых фармакопеях, сам он для научных целей используется редко. Например, ВЭТСХ нашло свое применение в экспресс-анализе компонентов гинкго [110]. Выбор авторов связан с задачей оценки влияния набора фитоактивных соединений (таких как глюкоза, хлориды, малеиновая кислота и т. д.) на накопление веществ. При такой постановке задачи вполне приемлем метод с более низкой точностью.

В качестве альтернативного метода приводится использование для количественного определения ИК-спектрометрии в области 1100–2500 нм [111]. Данный метод также упоминается как пример в обзоре без указания метрологических характеристик [112].

По мнению авторов другой статьи, альтернативой может быть МС-спектрометрия с прямым вводом, сопряженная с детектором по испарению и рассеиванию. Таким способом анализировали водную вытяжку из листьев. Сравнивали метод с ВЭЖХ с детектором по испарению и рассеиванию. Значимым отличием была только стабильность скорости потока – 97 % для МС-ELSD и 104 % для ВЭЖХ-ELSD [113].

Отдельно стоят уникальные методики, призванные решать узкие задачи. Так, в литературных источниках есть пример ВЭЖХ-ЯМР. То есть после

хроматографического анализа (методами ВЭЖХ-УФ) собранные фракции подвергали исследованию ^{1}Н ЯМР.

Совместное определение флавоноидов и терпеновых трилактонов. Есть пример УВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором [114]. Метод использовали для анализа пищевых добавок на основе гинкго. Одновременно определяли 7 классов веществ, в том числе гинкголиды и флавоноиды. Точность метода для гинкголидов варьировалась от 3 до 6 % при внутридневных испытаниях и от 6 до 19 % при анализе в разные дни. Особенностью методики является возможность определить гинкголевую кислоту – токсическое соединение, ограничиваемое по содержанию в листьях гинкго.

Подробное одновременное определение главных 11 компонентов экстракта гинкго проводили в следующей работе [115]. Основой метода являлась ВЭЖХ-МС/МС. Использовали градиентный режим из смеси метанол – раствор муравьиной кислоты. Методика с высокой линейностью (0,9975), но колебанием внутридневной точности от 1,6 до 3,7 % при внутридневных и от 1,1 до 11,9 % при анализе в разные дни.

Совместное определение использовали в анализе инъекционного препарата на основе гинкго билоба (называемого в Китае Xingxiong injection) [116]. Использовали метод ВЭЖХ-МС и градиентный режим смеси 0,1%-й муравьиной кислоты и ацетонитрила. Причем авторам удалось достичь хороших показателей точности: до 0,86 % – при внутридневном и до 3,23 % – при анализе в разные дни.

Похожие настройки использовали для определения метаболитов терпеновых трилактонов в моче после перорального применения у добровольцев [117]. Применяли методику Ультра-ВЭЖХ-МС. В качестве подвижной фазы использовали смеси раствора муравьиной кислоты и метанола в градиентном режиме от 8 до 90 %.

По результатам изучения литературы можно выделить основные преимущества и ряд недостатков у рассмотренных методов (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнение методов с различными способами регистрации относительно приемлемости для анализа ТТЛ

Метод	Преимущества	Недостатки	Примечания
ВЭЖХ-МС (ESI)	Высокая специфичность при средней чувствительности	Малое распространение из-за дороговизны оборудования	Наилучшие результаты были показаны именно для ESI-детектора
ВЭЖХ-Р	Распространен и доступен	Не высокая чувствительность. Не специфичен. Невозможность использования градиентного режима	Характерна неустойчивость базовой линии
ВЭЖХ-УФ	Широко распространен и доступен. Возможность одновременного определения флавоноидов	Низкая чувствительность из-за низкой абсорбции ТТЛ	Используют регистрацию при 220 нм. Практически не пригоден для ТТЛ
ВЭЖХ-ELSD	Высокая чувствительность и специфичность. Возможность одновременного определения флавоноидов	Достаточно дорог и сложен в использовании. Ограничено применение буферов практически не распространен	–
ГХ	Достаточно чувствителен. Распространен	Требуется дериватизация соединениями кремния	–
КЭ	Простота использования	Высокая продолжительность анализа, малая чувствительность УФ- регистрация)	Только две публикации
СУЖХ	–	Сложен и практически не доступен	Имеется лишь пара работ

1.4.3. Способы стандартизации винпоцетина

Винпоцетин представляет собой полусинтетический аналог алкалоида барвинка малого – винкамина. По строению винпоцетин представляет собой этиловый эфир аповинкаминовой кислоты. Название данного вещества согласно ИЮПАК – этиловый эфир 3α,16α-эбурнаменин-14-карбоновой кислоты. Таким образом, винпоцетин можно рассматривать как производное соединения, представленного на рисунке 4.

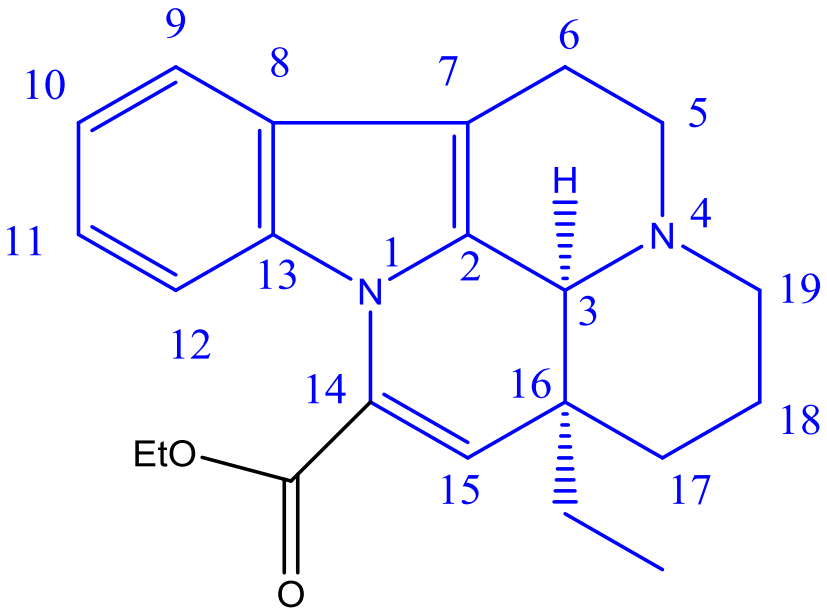


Рисунок 4 – Структура винпоцетина (**Вн**) с указанием нумерации атомов

Впервые винпоцетин был синтезирован Лоринцом и др. из винкамина [117]. Позднее был предложен химический синтез винкамина, с использованием которого был получен удовлетворительный выход винпоцетина [118]. Далее развитие синтеза эбурнамениновых алкалоидов шло по пути замены природных исходных веществ более доступными синтетическими. Так, были предложены несколько новых путей синтеза из енамина производных триптофана [119].

Винпоцетин представляет собой белый или слегка желтоватый кристаллический порошок. Сам винпоцетин практически не растворим в воде, умеренно растворим в спирте, диметилформамиде.

Среди описанных свойств винпоцетина следует отметить оптическую активность (углероды эбурнамина в положениях 3 и 16), а также характерный спектр поглощения: для раствора в 0,05М соляной кислоте максимумы при 224, 269 и 314 нм [120].

Поэтому фармацевтический анализ препаратов винпоцетина преимущественно проводят УФ-спектроскопией при 314 нм. Из-за специфичности данной длины (в этой области не поглощает ни пирацетам, ни вспомогательные вещества) УФ-спектроскопия остается основным методом количественного определения и способом подтверждения присутствия винпоцетина.

Вместе с тем ведутся разработки лекарственных форм с модифицированным высвобождением. Так, были проведены исследования по включению винпоцетина в липосомы [121]. В рамках задач данной работы статья интересна с точки зрения используемого метода стандартизации. Количественное содержание винпоцетина в разных фазах липосом проводили методом ВЭЖХ-УФ на колонке С18 с использованием в качестве подвижной фазы смеси метанола с 0,9%-м карбонатом аммония в соотношении 9:1. Обращает на себя внимание использование для обнаружения нехарактерную для винпоцетина длину волны (273 нм). Помимо анализа количественного содержания авторы определяли высвобождение винпоцетина из формы *in vivo*. Содержание винпоцетина в плазме определяли сходной методикой ВЭЖХ, отличающейся от вышеуказанной составом подвижной фазы (метанол : вода : ледяная уксусная кислота 70:30:0,1) [122]. Особенностью данной работы является технологическая ее направленность. Авторы не фокусировались на определении метрологических свойств используемой методики, поэтому сложно судить о его точности и приемлемости для других объектов анализа.

В том же году была опубликована работа, посвященная определению винпоцетина и аповинкаминовой кислоты в плазме крови крыс [123]. Авторами публикации предложен метод УВЭЖХ с масс-спектрометрией. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола, 0,19%-го раствора аммония ацетата и муравьиной кислоты в соотношении 40:60:0,1. Преимуществами работы являются одновременное определение винпоцетина и аповинкаминовой кислоты, а также проведенная валидация разработанного метода. Предел обнаружения 0,25 и 0,5 нг/мл для винпоцетина и аповинкаминовой кислоты соответственно. Коэффициенты аппроксимации для линейной модели были не менее 0,9970 и 0,9984, точность между измерениями 3,82 и 8,49 %, а воспроизводимость находилась в пределах 96,7–105,0 % и 95,6–105,6 % соответственно. В работе рассматривался диапазон концентраций от 0,5 нг/мл до 0,5 мг/мл.

Согласно современным представлениям активным метаболитом винпоцетина является аповинкаминовая кислота. Поэтому данное соединение

широко рассматривается в методиках ВЭЖХ-МС [123]. Также опубликован метод анализа данного соединения отдельно от винпоцетина с целью отслеживания фармакокинетики последнего. В качестве аналитического метода используют ВЭЖХ-УФ при 311 нм. Авторы используют подвижную фазу из метанола и буфера, полученного доведением 0,1%-го раствора трифторуксусной кислоты до pH 2,3, в соотношении 55:45 при скорости потока 1,2 мл/мин. Использование такого подхода обеспечивало следующие метрологические показатели: пределы использования от 2,4 до 240 нг/мл, точность от 87,3 до 93,2 %, воспроизводимость 100,2–104,7 % во внутридневных и 100,1–106,3 % в междневных испытаниях, стандартное отклонение 3,38 %, коэффициент аппроксимации 0,9998.

Все имеющиеся в настоящее время публикации по вопросу количественного определения винпоцетина сравнили по метрологическим характеристикам (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение метрологических характеристик различных методов количественного определения винпоцетина

Метод	**Точность, %**	**Воспроизводимость**		**Линейность**
		внутридневная	**междневная**	
УВЭЖХ-МС	3,82	96,7–105,0	–	0,9970
ВЭЖХ-УФ	–	–	–	0,998
ГХ-МС	60	–	–	0,999
ВЭЖХ-УФ	87,3–93,2	100,2–104,7	100,1–106,3	0,9998

Отдельно рассматривается вопрос определения чистоты субстанции винпоцетина. Так, согласно Британской фармакопее, в субстанции допустимы примеси этилвинкамината (не более 0,6 %), аповинкаминовой кислоты (не более 0,5 %), метоксивинкамината (не более 0,3 %) и дигидровинпоцетина (не более 0,5 %). Отделение и анализ в одной пробе для столь похожих веществ возможен только при использовании хроматографических методов. Поэтому определение примесей проводят методом ВЭЖХ-УФ при 280 нм на колонке С18, подвижная фаза: раствор аммония ацетата (15,4 г/л) : ацетонитрил в соотношении 45:55.

Для упрощения собрали данные литературы о примесях, упомянутых в других литературных источниках (Таблица 8).

Таблица 8 – Сводные данные о примесях винпоцетина, описанных в литературе

Обозначение	**Химическое название (или синоним)**	**Формула**	**Молярная масса**	**Природа и происхождение**
Примесь A ImpA	Этилвинкаминат (Ethyl vincaminate)	$C_{22}H_{28}N_2O_3$	368,47	Промежуточный продукт синтеза
Примесь B ImpB	Аповинкамин / Метилаповинкаминат	$C_{21}H_{24}N_2O_2$	336,43	Технологическая примесь
Примесь C ImpC	Этил-12-этокси-аповинкаминат	$C_{23}H_{28}N_2O_3$	380,49	Побочный продукт
Примесь D ImpD	Дигидровинпоцетин	$C_{22}H_{28}N_2O_2$	352,48	Продукт гидрирования
Примесь G ImpG	Этил-транс-аповинкаминат (изомер)	$C_{22}H_{26}N_2O_2$	350,46	Эпимер
Примесь E ImpE	Аповинкаминовая кислота	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	322,40	Продукт гидролиза
Примесь F ImpF	Аповинкаминамид	$C_{20}H_{23}N_3O$	321,42	Побочный продукт синтеза
Vincamone ImpX	Эбурнамонин (Примесь 23)	$C_{19}H_{22}N_2O$	294,39	Продукт деградации

Примесь A (**ImpA**) описана как промежуточный продукт синтеза и является не полностью дегидратированным продуктом, структурно отличающимся от винпоцетина на молекулу воды. Аповинкамин (**ImpB**) также технологическая примесь, которая возникает при использовании метанола в процессе синтеза (продукт реакции переэтерификации). Примесь C (**ImpC**) является побочным продуктом и образуется при введении этильной группы в ароматическое кольцо в специфических условиях синтеза. Примесь D (**ImpD**) – продукт гидрирования из-за избыточного восстановления двойной связи в цикле. Примесь G (**ImpG**) является эпимером (оптическим изомером). Примесь E (**ImpE**) – это продукт гидролиза. Образуется при расщеплении сложного эфира под действием влаги

или ферментов. Примесь F (**ImpF**) – побочный продукт синтеза, возникающий на стадиях амидирования промежуточных звеньев. Эбурнамонин (Vincamone, **ImpX**) – продукт деградации, а также может присутствовать как остаточный исходный алкалоид растительного происхождения при полусинтетическом пути получения. Для готовых форм контролируют примеси A и E, а также Эбурнамонин, так как их профиль может характеризовать стабильность, остальные примеси характеризуют качество исходной субстанции, принимая во внимание способы получения.

Поэтому использование аповинкаминовой кислоты в качестве намеренно вносимой специфической примеси используется при доказательстве специфичности методики определения винпоцетина [124]. В то же время описан анализ смесей винпоцетина с разными веществами. Так, есть работа по одновременному определению винпоцетина и фолиевой кислоты [120].

Таким образом, анализ компонентов экстракта гинкго и винпоцетина представляют собой достаточно сложные задачи, решение которых находит с каждым годом новое воплощение. Сложной является задача оптимизации методов анализа лекарственной формы, содержащей как экстракт, так и винпоцетин вместе. Исходя из уже разработанных методик и оснащения лабораторий фармацевтических заводов, предпочтительным методом анализа, с нашей точки зрения, является ВЭЖХ-УФ.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

Исходя из данных о препаратах, зарегистрированных на территории РФ в течение последних 5 лет, наиболее популярной формой в общем и экстракта листьев гинкго, в частности, являются твердые пероральные формы (преимущественно таблетки), при этом среди технологии получения таблетированных форм экстракта гинкго данных недостаточно. Технология получения таблетированных форм различных экстрактов во многом зависит от свойств самого экстракта. Например, для ряда экстрактов лекарственных

растений применимо прямое прессование, в то время как для некоторых только гранулирование (из-за низкой сыпучести таблеточных смесей). Обычно наблюдаются низкая распадаемость таблеток и/или снижение высвобождения веществ в тесте «Растворение», подобное снижение фармацевтико-технологических показателей требует дополнительного введения вспомогательных веществ. Для плохо растворимых и гидрофобных веществ используют как введение специализированных веществ (β-циклодекстрин), так и супердезинтегрантов (таких как кроскармеллоза, кросповидон). Причем использование наполнителей для растительных экстрактов и для трудно растворимых веществ не отличаются: упоминаются лактоза, МКЦ, глюкоза, реже модифицированные полимеры, такие как ГПЦ.

При стандартизации экстракта гинкго проблема заключена в определении двух групп веществ с различными физико-химическими и химическими свойствами: флавоноидов и терпеновых трилактонов. Описано множество различных методов хроматографического анализа, включая экзотические (ВЭЖХ-ЯМР, ВЭТСХ) и широко распространённые в анализе биологических объектов (ВЭЖХ-МС). Стандартизация флавоноидов обычно основана на применении ВЭЖХ-УФ после гидролиза до агликонов. Для терпеновых трилактонов анализ затруднен использованием дериватизации и до сих пор активно исследуется. Подавляющее большинство методов анализа на основе ГЖХ применимо только с предварительным силилированием. Сами терпеновые трилактоны крайне стабильны. Среди химических свойств терпеновых трилактонов отмечаются реакции алкилирования, ацилирования и раскрытия лактонов. При этом некоторые реакции, типичные для лактонов, не рассмотрены в публикациях.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В исследованиях использовали активные фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества, соответствующие нормативным документам (Таблица 9). На момент проведения исследований сроки годности использованных вспомогательных веществ не истекли.

Использованное оборудование приведено в таблице 10.

Таблица 9 – Список активных фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, используемых в исследованиях

Наименование вещества	**Производитель; нормативная документация**
Винпоцетин	Covex, Испания;
Экстракт листьев гинкго двулопастного сухой стандартизированный	Finzelberg, Германия;
Микрокристаллическая целлюлоза для прямого прессования (Heweten Type 200)	JRS Pharma, Германия; Ph. Eur.
Маннит для прямого прессования (Parteck M 200)	Merck, Германия; Ph. Eur.
Лактоза для прямого прессования (Emprove Lactose)	Merck, Германия; Ph. Eur.
Микрокристаллическая целлюлоза в сферических гранулах (Cellets 200)	Pharmatrans Sanaq, Швейцария; Спецификация производителя, Ph. Eur.
Декстраты (Emdex)	JRS Pharma, Германия; Ph. Eur.
Сахарная крупа (Vivapharm Sugar)	JRS Pharma, Германия; Ph. Eur.
Микрокристаллическая целлюлоза для влажного гранулирования (Flocel 101)	GMW, Индия; Ph. Eur.
Кремния диоксид коллоидный (Aerosil 200 Pharma)	Evonik, Германия; Ph. Eur.
Гидрофобный кремния диоксид коллоидный (Aerosil R 972)	Evonik, Германия; Ph. Eur.
Комплексный наполнитель на основе силицированной микрокристаллической целлюлозы (Prosolv SMCC 90)	JRS Pharma, Германия; Ph. Eur.
Низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза (L-HPC-21)	Shin-Etsu, Япония; Ph. Eur.
Гипромеллоза (Pharmacoat 603)	Shin-Etsu, Япония; Ph. Eur.
Поливинилпирролидон (Kollidon 25)	BASF, Германия; Ph. Eur.
Лактозы моногидрат (Parteck L 100)	Merck, Германия; Ph. Eur.
Маннит (Parteck M 100)	Merck, Германия; Ph. Eur.

Продолжение таблицы 11

Наименование вещества	**Производитель; нормативная документация**
Циклодекстрины (Cavamax)	Wacker Chemie, Германия; Ph. Eur.
Частично прежелатинизированный крахмал (Starch 1500)	Colorcon, США; USP
Кросповидон (Polyplasdone XL)	Ashland / ISP, США; USP
Кросповидон (Polyplasdone XL-10)	Ashland / ISP, США, USP
Натрия кроскармеллоза (Disolcel)	Mingtai Chemical, Тайвань; USP
Полисорбат-80 (Твин-80)	Panreac, Испания; Ph. Eur.

Таблица 10 – Список использованного оборудования

Наименование прибора	**Модель, производитель**
Тестер прочности таблеток на раздавливание	ТВН 125, «ERWEKA», Германия
Тестер распадаемости таблеток и капсул	PTZ-S, «Pharma Test», Германия
Тестер прочности на истираемость (фриабилятор)	Модель 545 Р-АК-8, Россия
Жидкостный хроматограф с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами	Agilent 1200 (детектор Agilent G1315D, масс-спектрометр Bruker micrOTOF-Q II), США / Германия
Хроматографическая колонка	Agilent Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм), США
Насос вакуумный мембранный	MVP 10 basic, «IKA», Германия
Испаритель ротационный	RV 3, «IKA», Германия
Спектрофотометр ультрафиолетовый сканирующий	СФ-2000, ООО «ОКБ Спектр», Россия
Пресс таблеточный гидравлический лабораторный	РП-24, Россия
Шкаф сушильный стерилизационный	ШС-80-01 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия
Мешалка магнитная с подогревом	RCT basic, «IKA», Германия
Тестер растворения (на 6 станций)	Inspire 6 basic, «Pharma Test / Hanson Research», Индия
Спектрофлуориметр (Флуориметр)	HORIBA Fluorolog-3, Horiba Jobin Yvon, Япония
Спектрометр ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^{1}H)	Bruker Avance 400, Bruker, Германия

2.2. Методики

Спектры ЯМР ^{1}H были записаны на спектрометре «Bruker Avance 400» (400 МГц), внутренний стандарт – $SiMe_4$. Масс-спектры (тип ионизации – электроспрей) при атмосферном давлении (APCI) записаны на приборе серии «MicrOTOF-Q II» фирмы «Bruker Daltonics» (Бремен, Германия).

2.2.1. Методики оценки фармакологической активности

Исследования фармакологических свойств проводили при внутрижелудочном введении композиций. В ходе исследования использовали белых беспородных крыс-самцов массой 250–300 г. Введение лабораторным животным осуществлялось в виде суспензии в 1%-м крахмальном клейстере.

Угасание следа пассивного избегания. Исследование влияния композиций на память проводили по методике угнетения рефлекса пассивного избегания с естественным ослаблением памятного следа [125]. Устройство представляло собой две соединенные камеры размером 40×40 см и 20×20 см. Большая из камер освещалась лампой накаливания 50 Вт, вторая являлась темной. В пол темной камеры встроена электрическая пластинка, подключаемая к генератору тока. Для выработки рефлекса животное помещали в светлый отсек установки хвостом к входу в темный отсек. Засекали время с посадки животного до его захода в темную камеру (латентный период). Затем в камере животного наказывали переменным электрическим током (50 μА, 20 Гц). Крыса под болевым воздействием переходила в светлый отсек. Животное, не зашедшее после выхода обратно в течение 30 с, считалось обученным. При проверке сохранения памяти у грызунов животное помещали аналогично вышеописанной методике и фиксировали латентный период, а также признаки волнения до момента захода в темный отсек.

Тест открытого поля. Реакции животного фиксировали до введения, а также спустя 30, 60, 90 и 120 минут после введения композиций. Каждое животное наблюдали в течение 3 минут, регистрируя период нахождения животного на центральной площадке, горизонтальную (по количеству пересеченных секторов) и вертикальную (по количеству вставаний на задние лапы) двигательную активность, исследовательскую активность (по количеству исследованных «норок»).

Тест принудительного плавания. Возможные седативный и анксиолитический эффекты фиксировали в тесте неизбежной ситуации, а именно вариации принудительного плавания. Крысу помещали в стеклянный цилиндр высотой 40 см, заполненный водой на одну треть. Регистрировали период

от помещения животного в цилиндр до принятия им характерной позы, а также количество активных попыток выбраться из цилиндра.

Статическая работоспособность. В качестве методики исследования работоспособности был выбран вариант статической работоспособности. Для этого животное помещали на горизонтально расположенную сетку экран размером 60 на 45 см. Экран переворачивался на 180 °С, так чтобы животное повисало на сетке, располагая ее на 80 см над полом. Фиксировали время удерживания животного на сетке в трех повторах. Как показатель использовали суммарную продолжительность нахождения животного на сетке в трех повторах.

2.2.2. Разработка составов и технологии таблеток

Смешивание компонентов таблеточной массы (в навесках до 100 г) осуществляли гравитационным методом в герметичной цилиндрической полимерной емкости объемом 200 мл путем многократного разнонаправленного инвертирования (переворачивания).

Комплексное изучение фармацевтико-технологических характеристик вспомогательных веществ и полученных таблеточных масс проводили в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ XV издания на базе сертифицированного оборудования. Оценку индивидуальных показателей выполняли согласно соответствующих ОФС (сыпучесть, насыпную плотность таблеточных масс, распадаемость, растворение, прочность на истирание, прочность на разлом).

Получение гранулята. Гранулят для каждого опыта получали смешиванием винпоцетина, экстракта гинкго и наполнителя в течение 15 минут до однородности, смачивали полученную смесь расчетным количеством связующего раствора, гранулировали через пробивное сито лабораторное (С30/50, НС, перф. лист 1,5 мм) и высушивали в сушильном шкафу ШС-80-01 СПУ при температуре 60 °С в течение 30 минут, повторно протирали через сито лабораторное (С30/50, НС, перф. лист 1,0 мм). Полученный гранулят опудривали смесью дезинтегранта и магния стеарата. Измеряли сыпучесть полученной

таблеточной массы согласно общепринятой методике (ОФС.1.4.2.0016 «Сыпучесть порошков»). Навески порошков таблетировали пуансонами диаметром 9 мм на гидравлическом таблеточном прессе РП-24.

2.2.3. Методы стандартизации таблеточных масс, гранулятов и готовых таблеток

Методики получения флуоресцентных меток и оценки продуктов реакции. Синтез флуоресцентных меток проводили из коммерчески доступного пирена. Оценка полноты проведения реакции осуществлялась методами ТСХ, ^{1}H и ^{13}C ЯМР [ЯМР ^{1}H спектрометр «Bruker Avance-400» (400 МГц), Германия]. Полнота процессов дериватизации оценивалась с помощью масс-спектроскопии методом прямого ввода, а также ВЭЖХ-МС. Подробный синтез флуоресцентных реагентов приведены в Приложении А.

Концентрирование ТТЛ из экстракта гинкго выполнено в соответствии с методикой, описанной в литературе без очистки колоночной хроматографией. Содержание ТТЛ составило 40 % [126].

Функционализация ТТЛ 1-аминометилпиреном. Концентрат ТТЛ (68 мг) обезвоживали в о-ксилоле (10 мл) с применением насадки Дина – Старка. Добавили 1-аминометилпирен (20 мг) и катализатор (смола КУ-1, 200 мг) и смесь кипятили в течение 6 часов.

Функционализация ТТЛ 1-аминометилпиреном в 10%-й соляной кислоте. Смесь концентрата ТТЛ (68 мг), 1-аминометилпирена (35 мг) и 1 М соляной кислоты (33 мл) кипятили, аликвоты отбирали через 5, 11 и 14 часов после начала кипячения. Максимальная интенсивность пиков производных ТТЛ наблюдалась в аликвоте 2 (кипячение в течение 11 часов). Масс-спектр, $[M + H]^{+}$, m/z (Iотн (%)): 1) 640.26 (21000), рассчитано для $C_{37}H_{37}NO_9$ 640.25; 2–3) 656.25 (3880), рассчитано для $C_{37}H_{37}NO_{10}$ 656.25; 4) 672.25 (875), рассчитано для $C_{37}H_{37}NO_{11}$ 672.24; 5) 558.22 (960), рассчитано для $C_{32}H_{31}NO_8$ 558.21.

Отобранные пробы анализировали методом УФ-спектрофотометрии в диапазоне от 230 до 430 нм. Регистрировали значения оптической плотности

при длинах волн (314 ± 1) нм и (270 ± 1) нм. Спектры в УФ и видимой области снимали с использованием спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). При сравнении поглощения использовали 10^{-5}М растворы исследуемых веществ в смеси ацетонитрил : вода 35:65.

Сыпучесть и насыпную плотность таблеточных масс, а также «Распадаемость» и «Растворение» проводили согласно фармакопейным методикам. Прочность на истирание проверяли с помощью фриабилятора 545 Р-АК-8, Россия, прочность на раздавливание – тестер Erweka TBH 125. Распадаемость проверяли тестером распадаемости PTZ-S, Германия.

Тест растворение. Растворение модельных таблеток проводили в 0,1М растворе хлористоводородной кислоты. Объем среды растворения составлял 500 мл. Использовали тестер растворения Inspire 6 basic на 6 станций, Индия. Температура среды растворения поддерживалась с помощью термостата на протяжении всего исследования и составляла (37 ± 2) °С. Скорость вращения 100 об./мин. В сосуд для растворения поместили 500 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Довели температуру среды растворения до (37 ± 2) °С. Поместили одну таблетку в сосуд для растворения, отбирали аликвоту 1 раз в минуту в течение первых 10 минут, а затем 1 раз в 5 минут до полного растворения таблетки. Испытание проводилось для трех таблеток из каждой параллели образцов, растворитель не восполняли.

Определение содержания компонентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографические методы анализа проводили с помощью хроматографа Agilent 1200 DAD, с диодно-матричным детектором Agilent G1315D и масс-спектрометром Bruker micrOTOF-Q II. Колонка С18 150×4.6 5µм Agilent Eclipse XDB с предколонкой.

1. Градиентная ВЭЖХ-УФ для определения родственных примесей (Методика РП). Хроматографическое разделение проводили смесью 0,1%-й муравьиной кислоты и ацетонитрила согласно градиентному режиму: с 0 до 20 минут – от 15 до 90 % ацетонитрила, далее до 25 минут – 90 %, от 25 до 30 минут – от 90 до 15 %. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

2. Схема совместной пробоподготовки для количественного определения винпоцетина и суммы флавоноидов. Навеску модельной смеси около 0,6 г экстрагируют 20 мл смеси изопропанола с 1М соляной кислотой под воздействием ультразвука. Полученную взвесь отфильтровывали, пятикратно промывая остаток на фильтре. К фильтрату добавляли 5,0 мл раствора стандарта (дротаверина гидрохлорида) и доводили тем же растворителем до 50,0 мл. 5,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки растворителем. Полученный раствор использовали для количественного определения винпоцетина методом ВЭЖХ-УФ. Гидролиз оставшейся части пробы проводили в течение двух часов при 90 °С. 5,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу объемом 25 мл и доводили растворителем до метки. Точную навеску около 0,25 г дротаверина гидрохлорида растворяли в смеси изопропанол : 1М соляная кислота (1:1) и доводят до 25 мл.

3. Количественное определение агликонов флавоноидов и винпоцетина (Методика ФиВн). В качестве подвижной фазы использовали смеси ацетонитрила с фосфатным буфером (pH 4,5). Подвижная фаза из смеси ацетонитрила и фосфатного буфера (pH 4,5) в соотношении 35:65 для винпоцетина и 45:55 для агликонов флавоноидов. Объем пробы составлял 5 мкл на всех этапах. Детектирование вели одновременно при следующих длинах волн: 254, 280, 318 нм (использовали для определения винпоцетина), 360 и 370 нм (использовали для анализа агликонов флавоноидов). На этапах разработки применяли ВЭЖХ-МС детектором (ионизация – электроспрей в положительном или отрицательном режимах).

2.3. Обработка данных и их визуализация

Обработка результатов исследования производилась посредством MC Office 2007 Excel и Stat Soft STATISTICA 10, графическая визуализация – SciDAVis 0.2.4., ChemBioDraw Ultar 14.0.

2.4. Дизайн исследования

Исследование условно разделено на три части: фармакологическую (для обоснования состава действующих веществ), технологическую (разработка рецептуры и/или способа получения таблетированной формы) и химическую (выбор критических показателей качества и разработка конкретных методик, рисунок 5).



Рисунок 5 – Дизайн исследования

ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ

При изучении фармакологического действия экстракта гинкго в сочетании с различными веществами были использованы методики выявления изменений функционального состояния высшей нервной деятельности животных: таких как память, поведение, агрессивность, работоспособность, реакция на неизбежную угрожающую ситуацию.

Изучение изменений поведенческих реакций после первого введения проводили по тесту открытого поля. Внутривидовую агрессивность изучали с помощью общепринятого теста раздражения пары животных, помещенных в прозрачную камеру с электрическим полом.

Все проведенные фармакологические исследования можно разделить на три этапа. Первый этап предназначался для выявления положительных комбинаций экстракта гинкго с различными нутриентами, традиционно применяемыми для вспомогательной терапии заболеваний нервной системы. В исследование включили витамины группы В (пиридоксина гидрохлорида – 5 мг/кг, тиамина гидрохлорида – 25 мг/кг, цианокобаламин – 0,16 мг/кг, рибофлавин – 5 мг/кг), а также магния оксид (83 мг/кг), глицин (50 мг/кг) и токоферол (2 мг/кг). Для этого трижды фиксировали показатели поведенческой активности в тесте открытого поля: до манипуляций, после введения одного из вышеуказанных веществ и после введения комбинации этого же вещества с экстрактом гинкго в дозе 40 мг/кг одной и той же группе животных.

На втором этапе было решено исследовать влияние смеси винпоцетина с экстрактом листьев гинкго на различные функции ЦНС. Помимо этого, на данном этапе рассматривалась целесообразность включения в композицию комплекса магний-пиридоксин и глицина дополнительно к двум действующим веществам. Для оценки эффективности всех композиций в исследовании выделили группу животных, получавших вещество сравнения – пирацетам.

В результате было сформировано шесть групп животных, получавших соответственно:

1) винпоцетин в дозе 2,7 мг/кг в смеси с экстрактом гинкго в дозе 17,2 мг/кг;

2) винпоцетин в дозе 2,7 мг/кг в смеси с экстрактом гинкго в дозе 17,2 мг/кг, магния оксидом в дозе 35 мг/кг и пиридоксина гидрохлоридом в дозе 0,4 мг/кг;

3) винпоцетин в дозе 2,7 мг/кг в смеси с экстрактом гинкго в дозе 17,2 мг/кг и глицином в дозе 21,4 мг/кг;

4) пирацетам в дозе 85,7 мг/кг;

5) раствор крахмала 1 % в эквивалентном объеме;

6) интактная группа.

Все вещества вводили в виде суспензии в 1%-м растворе крахмала ежедневно на протяжении 42 дней. В течение этого периода проводили регистрацию поведенческих реакций в тесте открытого поля на 5, 9, 35, 39 и 42-е сутки после начала введения. Выработку рефлекса избегания проводили на 5-е и 35-е сутки после введения. Проверку сохранения рефлекса избегания осуществляли на 1-е, 4-е и 7-е сутки после выработки, что соответствовало 6, 9, 12 и 36, 39, 42-м суткам от начала введения. В ходе третьего этапа рассматриваемых исследований изучали воздействие различных доз винпоцетина при совместном применении с экстрактом гинкго на функции ЦНС. Животные были распределены на 10 экспериментальных групп, получавших следующие смеси (рисунок 6):

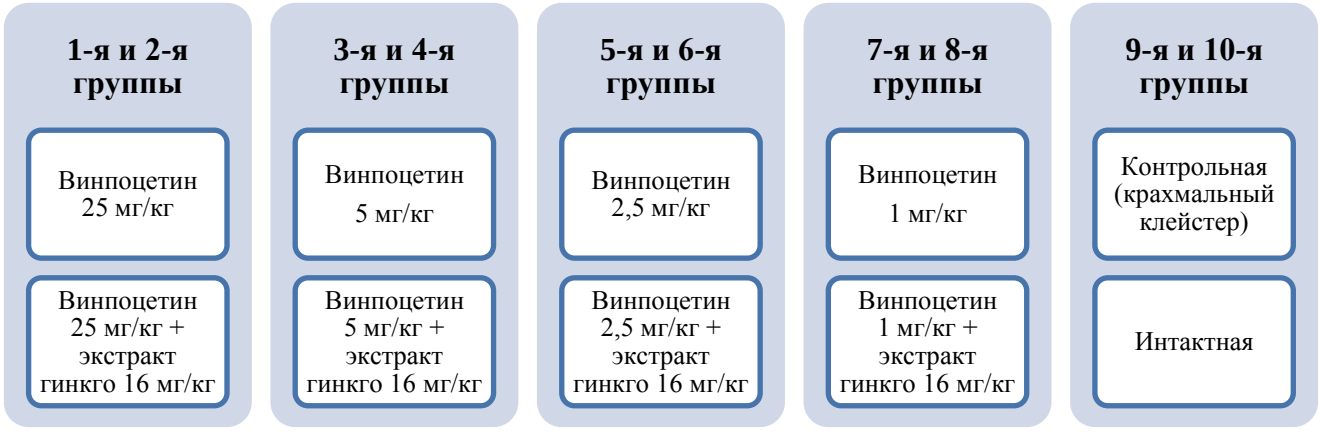


Рисунок 6 – Состав групп в исследовании для установления оптимального соотношения действующих веществ

При первом введении (1-е сутки) исследовали поведенческие реакции. На 6-е и 28-е сутки введения проводили выработку рефлекса избегания. Затем на 7, 10, 14 и 29, 32, 36-е сутки регистрировали показатели теста угасания реакции пассивного избегания (УРПИ). Работоспособность изучали до введения, а затем на 14, 48 и 64-е сутки. Тесты на агрессивность и отчаяние выполняли на 57 и 59-е сутки соответственно.

Спустя 80 суток с начала введения композиций животным однократно внутрибрюшинно вводили раствор нитрита натрия в дозе 30 мг/кг. Через 2 суток после моделирования указанным способом гемической гипоксии повторно фиксировали показатели статической работоспособности.

3.1. Выбор веществ, потенцирующих совместный эффект

Для первого этапа отбора комбинаций тест открытого поля на крысах. На данном этапе оценивали вещества, перспективные с точки зрения потенцирования действия экстракта гинкго. С целью облегчения интерпретации результатов теста данные представлены в виде отклонения от исходного уровня. Результаты теста «открытое поле» приведены в Приложении Б.

После сравнения результатов трех частей эксперимента были сделаны следующие предположения:

1. Витамины группы В, а также глицин способны потенцировать адаптогенное действие экстракта гинкго.

2. Уменьшение периода нахождения на центральном круге и увеличение двигательной активности животных после введения комбинаций пиридоксина или тиамина гидрохлоридов с экстрактом гинкго может свидетельствовать об их адаптогенной активности.

3. Смесь глицина с экстрактом гинкго при однократном введении стимулирует исследовательскую активность животных, что может свидетельствовать об адаптогенном действии данной смеси либо о снижении тревожности животных.

4. Анализ эмоциональной активности (количество актов груминга) не показало значимых различий как внутри групп на разных этапах, так и между группами.

Исходя из полученных результатов для последующих исследований были выбраны тиамина гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид и глицин, как вещества, способные модифицировать действие экстракта гинкго.

3.2. Уточняющее исследование по выбору веществ

В ходе второго этапа тест открытого поля был проведен в модификации, предполагающей повторное его проведение через более продолжительные периоды: поведенческие реакции фиксировались до введения, а также на 5, 9, 35, 39 и 42-е сутки введения. Использование именно этой версии теста позволило оценить помимо изменений этологических реакций также формирование и сохранение памяти при не ассоциативном обучении. Результаты теста приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Влияние исследуемых веществ на этологические реакции животных в тесте «открытое поле»

Группа	**Латентный период, секунды**					
	До	**5-е сутки**	**9-е сутки**	**35-е сутки**	**39-е сутки**	**42-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	4,3 ± 3,2	2,7 ± 1,9	2,0 ± 1,6	5,6 ± 9,2	3,4 ± 1,7	1,8 ± 1,1
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	2,0 ± 1,0*	4,2 ± 2,8	4,4 ± 4,3	1,2 ± 0,8$^{\#+}$	9,2 ± 11,6$^{@}$	1,4 ± 0,5$^{@}$
Интактный контроль	4,6 ± 2,4	7,2 ± 6,7	2,9 ± 2,2*	1,6 ± 0,5	2,0 ± 1,2	1,4 ± 0,9
Винпоцетин + гинкго + глицин	2,8 ± 1,4	5,0 ± 1,9 $^{+@}$	0,9 ± 0,4 $^{*\#+@}$	1,8 ± 0,8	3,2 ± 1,3	2,2 ± 1,6
Пирацетам	4,1 ± 2,2	3,7 ± 1,7	2,9 ± 2,5	8,8 ± 1,8#	9,8 ± 4,3#+	1,2 ± 0,8$^{@}$
Экспериментальный контроль	5,8 ± 3,2	6,1 ± 9,1	2,9 ± 1,6	2,8 ± 1,8	7,2 ± 6,3	2,4 ± 1,3

Продолжение таблицы 11

	Исследовательская активность, ед.					
Группа	**Исходно**	**5-е сутки**	**9-е сутки**	**35-е сутки**	**39-е сутки**	**42-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	3,4 ± 1,5*	1,6 ± 1,8	0,4 ± 0,5^{+}	1,2 ± 0,8	5,8 ± 5,8	1,4 ± 2,6
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	3,8 ± 2,2*	3,6 ± 2,9*	3,2 ± 5,0	1,0 ± 0,7	2,2 ± 1,9	4,4 ± 3,0
Интактный контроль	4,0 ± 2,4*	1,4 ± 2,2$^{+@}$	5,6 ± 7,1	0,4 ± 0,5^{+}	3,0 ± 6,4	2,6 ± 1,7
Винпоцетин + гинкго + глицин	2,0 ± 1,2	2,8 ± 3,3	1,8 ± 2,5$^{\#}$	1,6 ± 1,5	4,4 ± 3,2	0,4 ± 0,5
Пирацетам	3,6 ± 1,9*	0,6 ± 0,9	0,2 ± 0,4+	0,8 ± 0,8^{+}	1,4 ± 1,2+	1,4 ± 2,1
Экспериментальный контроль	1,0 ± 1,2	0,4 ± 0,9	1,4 ± 1,7	1,0 ± 1,0	1,4 ± 1,1	2,6 ± 2,3
	Горизонтальная двигательная активность, ед.					
Группа	**Исходно**	**5-е сутки**	**9-е сутки**	**35-е сутки**	**39-е сутки**	**42-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	32,6 ± 22,0	18,0 ± 15,2	8,2 ± 3,5^{+}	5,2 ± 2,9	43,2 ± 20,7*$^{@}$	5,8 ± 1,6$^{\#+@}$
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	20,2 ± 21,7	25,6 ± 14,8	16,0 ± 16,5	7,6 ± 7,1	20,4 ± 19,2$^{@}$	27,4 ± 21,6
Интактный контроль	28,6 ± 16,3*	23,0 ± 25,0*	40,8 ± 22,7	16,4 ± 24,9	36,6 ± 30,7	47,4 ± 36,2
Винпоцетин + гинкго + глицин	21,4 ± 13,2	27,6 ± 24,5	25,4 ± 22,2	10,2 ± 8,7$^{@}$	32,6 ± 18,0	8,8 ± 7,7
Пирацетам	34,4 ± 19,4	8,6 ± 6,9$^{+@}$	6,0 ± 5,6^{+}	5,0 ± 2,2+	3,8 ± 0,8*	8,0 ± 8,1
Экспериментальный контроль	11,2 ± 4,8$^{\#}$	1,8 ± 3,0	16,2 ± 11,9	4,6 ± 1,3+	11,6 ± 11,3	21,0 ± 15,3
	Вертикальная двигательная активность, ед.					
Группа	**Исходно**	**5-е сутки**	**9-е сутки**	**35-е сутки**	**39-е сутки**	**42-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	4,0 ± 2,8	1,4 ± 1,3	1,0 ± 1,0	0+	4,6 ± 2,9$^{*@}$	0,4 ± 0,9$^{\#@}$
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	3,0 ± 1,0	2,4 ± 2,9	1,2 ± 1,3^{+}	0,6 ± 1,3+	2,4 ± 3,6	1,2 ± 1,6
Интактный контроль	2,2 ± 2,0	3,6 ± 5,4*	5,4 ± 5,6	1,0 ± 2,2	4,8 ± 4,3	4,6 ± 3,4
Винпоцетин + гинкго + глицин	2,6 ± 2,7	2,2 ± 1,6$^{*\#}$	2,8 ± 1,8$^{\#}$	0,4 ± 0,9$^{@}$	5,4 ± 3,2	0,4 ± 0,5
Пирацетам	3,0 ± 1,6	0$^{+@}$	0,2 ± 0,4^{+}	0,2 ± 0,8	0$^{\#+}$	3,8 ± 4,0
Экспериментальный контроль	1,8 ± 2,2$^{\#}$	0$^{\#}$	2,6 ± 4,2	0,4 ± 0,9	0,6 ± 0,9	1,4 ± 1,7

П р и м е ч а н и е . * – достоверно относительно контроля, критерий Манна – Уитни ($p < 0,05$, $n = 10$); $^{\#}$ – достоверно относительно интактного контроля ($p < 0,05$, $n = 10$); $^{+}$ – достоверно отличается от исходного уровня для той же группы по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$, $n = 10$); $^{@}$ – достоверно отличается от рассматриваемого показателя, зафиксированного при предыдущем исследовании.

Сравнение полученных результатов контрольной группы с результатами интактной группы показало значимое снижение горизонтальной и вертикальной двигательных активностей у первой группы через 5 дней введения препарата. Такое понижение может свидетельствовать о стресс-реакции животных на процесс введения суспензий. Вместе с тем эта реакция исчезала на 9-е сутки введения, что свидетельствует об адаптации крыс к стресс-фактору.

Сравнение периодов нахождения животного на центральной площадке показало достоверное его снижение под воздействием композиций винпоцетина с экстрактом гинкго и винпоцетина, экстракта гинкго и глицина вместе. Такое снижение латентного периода может свидетельствовать об адаптогенном эффекте данных композиций. Эталонный препарат вызывал значимое повышение латентного периода особенно при длительном применении.

В результате эксперимента было выявлено повышение исследовательской деятельности в группах, получавших сочетания экстракт гинкго + винпоцетин и экстракт гинкго + винпоцетин + глицин. Особенно высоких значений данный показатель достигал через 39 суток после первого введения. Вместе с тем у группы, получавшей пирацетам, фиксировали стабильно низкие результаты по показателю исследовательская активность, сходные с результатами опытно-контрольной группы. Повышение исследовательской активности у интактных животных наблюдалось на 9-е сутки после введения, а у группы, получавшей сочетание винпоцетин + экстракт гинкго + пиридоксина гидрохлорид + магния оксид, наибольшие показатели приходились на 42-е сутки после введения.

У всех групп наблюдалось снижение горизонтальной двигательной активности на 35-е сутки после введения. Данное изменение, скорее всего, связано с длительным периодом между проведением теста на 9-е и 35-е сутки введения. Этот факт может быть объяснен проявлением реакции замирания (фризинга). То есть результаты, полученные после короткого и длительного курсов введения, могут быть рассмотрены раздельно. При сравнении активности групп после пятидневного курса введения двигательная активность возрастала у животных, получавших сочетание винпоцетин + экстракт гинкго + пиридоксин

гидрохлорид + магния оксид + глицином. У остальных групп крыс наблюдали снижение двигательной активности, причем наименьшие показатели по обоим видам двигательной активности наблюдали у группы, получавшей пирацетам. Такое снижение, также как и снижение исследовательской активности, может быть связано со снижением уровня тревожности (анксиолитическому эффекту) пирацетама. Поэтому можно предположить наименее выраженный седативный эффект у композиций, содержащих сочетания винпоцетин + экстракт гинкго + пиридоксина гидрохлорид + магния оксид или винпоцетин + экстракт гинкго + пиридоксина гидрохлорид + глицин. Вместе с тем у сочетания винпоцетина с экстрактом гинкго седативный эффект выше, чем у двух других комбинаций, но ниже, чем у группы, получавшей пирацетам.

Таким образом, результаты теста открытого поля позволяют предположить адаптогенную активность исследуемых комбинаций, а также показывают менее выраженный седативный эффект по сравнению с пирацетамом. Одной из общепринятых методик исследования ноотропного действия является метод угасания реакции пассивного избегания в различных вариациях. В рассматриваемой работе использовали подход естественного угасания памятного следа. Результаты теста УРПИ представлены в таблице 12.

Продолжительность латентного периода до захода в темный отсек у интактной и контрольной групп существенно не отличалась. В то же время контрольная группа после короткого курса введения показывала статистически значимое изменение данного показателя относительно его значения при выработке рефлекса. Причем повышение латентного периода при первой проверке как в контрольной, так и в интактной группах свидетельствует о положительном результате выработки. При последующих проверках изменения латентного периода были значимыми относительно предыдущих и исходных значений у контрольной группы после короткого курса введения. Таким образом, в варианте УРПИ с естественным угасанием памятного следа у контрольных групп наблюдается постепенное исчезновение памятного следа.

Таблица 12 – Продолжительность периода от помещения животного в установку до его перехода в темную камеру в тесте УРПИ

Группа	**Короткий срок введения, секунды (% от исходного уровня)**			
Сутки проведения	**0-е сутки**	**1-е сутки**	**4-е сутки**	**7-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	19,0 ± 26,9	79,0 ± 89,0 (40)	147,2 ± 69,1 (80)	83,4 ± 83,6 (40)
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	5,2 ± 3,7	83,0 ± 26,4 (40)	114,6 ± 26,7 (60)	29,2 ± 5,8 (0)
Интактный контроль	27,2 ± 43,8	61,4 ± 21, (20)	77,2 ±28,0 (40)	34,0 ± 19,4 (0)
Винпоцетин + гинкго + глицин	55,2 ± 33,7	104,8 ± 78,7 (40)	22,6 ± 28,6 (0)	10,8 ± 6,9 (0)
Пирацетам	35,6 ± 21,5	145,8 ± 72,1 (80)	89,0 ± 79,0 (40)	87,8 ± 80,7 (40)
Опытный контроль	9,6 ± 5,3	102,6 ± 67,7 (40)	54,4 ± 66,7 (20)	44,8 ± 71,4 (20)
Группа	**Длительный срок введения, секунды (% от исходного уровня)**			
Сутки проведения	**0-е сутки**	**1-е сутки**	**4-е сутки**	**7-е сутки**
Винпоцетин + гинкго	52,6 ± 44,4	147,0 ± 42,6 (60)	145,8 ± 72,1 (60)	54,4 ± 68,2 (20)
Винпоцетин + гинкго + Mg-B_6	24,6 ± 19,7	26,6 ± 29,7 (0)	76,4 ± 75,0 (20)	50,0 ± 22,2 (20)
Интактный контроль	39,2 ± 41,9	82 ,6 ± 85,3 (40)	45,0 ± 71,3 (20)	64,4 ± 64,9 (20)
Винпоцетин + гинкго + глицин	36,4 ± 46,3	161,0 ± 40,1 (80)	74,8 ± 90,6 (40)	76,0 ± 89,5 (40)
Пирацетам	19,8 ± 12,3	151,0 ± 61,1 (80)	161,6 ± 38,8 (80)	126,2 ± 71,1 (60)
Опытный контроль	31,6 ± 46,4	97,6 ± 81,0 (40)	13,2 ± 7,7 (0)	44,2 ± 71,7 (20)

Примечание. * – достоверно относительно опытного контроля, критерий Манна – Уитни ($p < 0,05$); # – достоверно относительно интактного контроля ($p < 0,05$); + – достоверно отличается от периода при выработке рефлекса для той же группы по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$); @ – достоверно отличается от рассматриваемого показателя, зафиксированного при предыдущем исследовании.

У группы, получавшей эталонный препарат (пирацетам), наблюдалось сохранение памятного следа со значимым его угасанием при последней проверке. Однако после обоих курсов значения превосходили таковые у интактной и контрольной групп. Таким образом, используемая модель адекватно отражает действие на память: результаты контрольных групп подтверждают отсутствие влияния на результат факта внутрижелудочного введения и подтверждает значимость угасания изучаемой величины, в то время как у эталонной группы фиксировали значительное увеличение периода до захода в темную камеру, что свидетельствует о потенциальном анксиолитическом эффекте.

Помимо латентного периода, тест УРПИ может быть оценен путем вычисления процента животных, сохранивших рефлекс, от общего числа

в группе. Значения данной величины представлены в таблице 12 в скобках. Анализ представленных результатов также свидетельствует об обоснованности использования теста и выбранных показателей.

После короткого курса введения композиций доля животных с сохраненным рефлексом избегания наименьшей была в контрольной группе. Аналогичный показатель эталонной группы превышал значения контрольной группы. Наибольший процент на первые сутки наблюдали в группе, получавшей пирацетам. Затем число животных с сохраненным рефлексом избегания снизилось до 40 %. При сравнении данного показателя с результатами группы, получавшей эталонный препарат, и контрольной группы, очевидно, проявилось положительное влияние пирацетама на сохранение памятного следа. Изучаемые композиции оказывали различное воздействие на процесс сохранения памяти. Сочетание винпоцетин + экстракт + глицин, а также то же сочетание с пиридоксином и магния оксидом не способствовали поддержке памятного следа в течение периода исследования.

Одновременно положительная тенденция была выявлена после введения сочетания винпоцетина с экстрактом гинкго. Данный состав способствовал сохранению памятного следа значимо дольше по сравнению с контрольными группами. Эффект данной композиции был сравним с эффектом эталонного вещества.

При более длительных сроках введения сочетания вышеуказанные тенденции сохранялись под воздействием сочетания винпоцетина с экстрактом гинкго, а также пирацетама в интактной и контрольной группах. В то же время два других исследуемых составов увеличили долю животных с сохраненным рефлексом по сравнению с коротким сроком введения.

Таким образом, сравнение данных продолжительности латентного периода до захода в темную камеру и долей животных с сохраненным рефлексом позволяет сделать вывод о положительном влиянии комбинации винпоцетина с сухим экстрактом листьев гинкго билоба на сохранение памятного следа при естественном его угасании.

3.3. Оптимизация состава за счет подбора доз для сочетания винпоцетина с экстрактом гинкго

В ходе третьего этапа основной задачей являлось установить оптимальное соотношение экстракта гинкго и винпоцетина. Вместе с тем в планировании и выполнении эксперимента учитывали отсроченное наступление целевых эффектов. Поэтому оценку показателей проводили через короткий и длительный период введения.

Взвешивание животных производили трижды в ходе эксперимента. Динамика изменения массы животных по группам представлена на рисунке 7. Изменения в массе были недостоверными по сравнению с контрольной и интактной группами. После короткого срока введения отмечалось незначимое отставание в наборе массы у группы, получавшей 2,5 мг/кг винпоцетина. Остальные группы демонстрировали очень близкие показатели по набору массы. Возможной причиной легкого отставания группы, получавшей винпоцетин в дозе 2,5 мг/кг, может быть влияние стресса, вызванного процессом внутрижелудочного введения или недостаточной стресспротективной активностью винпоцетина в этой дозе. Но так как дозы 1 и 5 мг/кг не вызывали отставания в приросте массы, возможно выпадение является случайным (Рисунок 7).

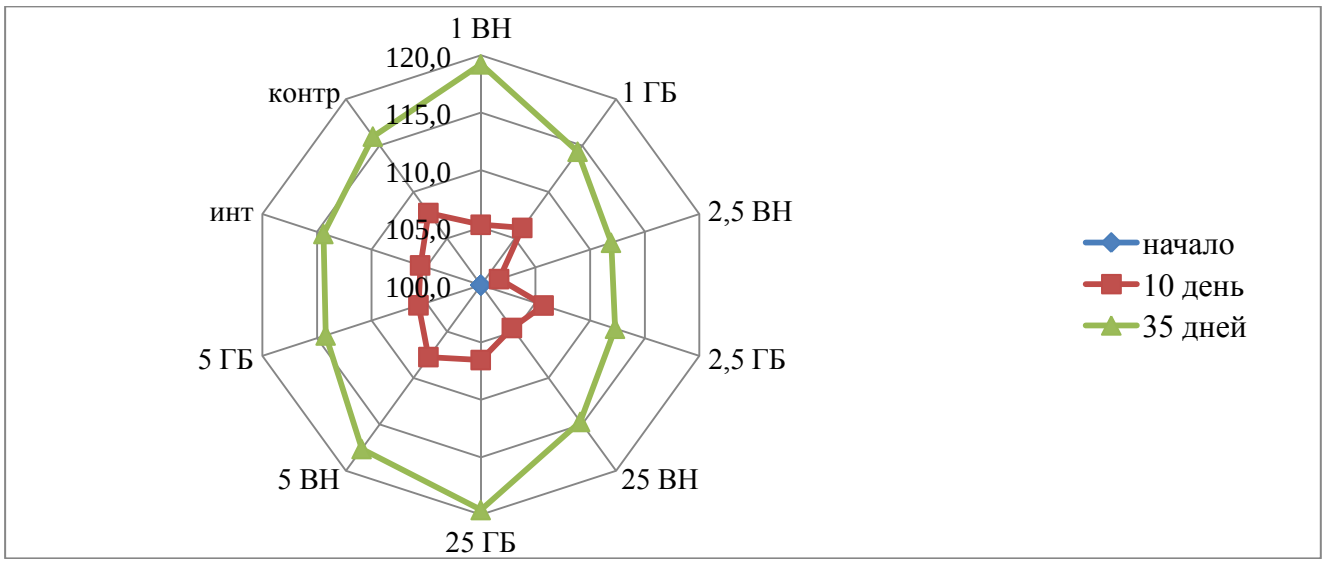


Рисунок 7 – Прирост средней массы в группах на протяжении эксперимента

После длительного курса введения разброс величин был больше, но оставался незначимым статистически. Меньший прирост массы тела был у групп, получавших 2,5 мг/кг винпоцетина и комбинацию экстракта с винпоцетином в дозах 2,5 и 5 мг/кг. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии общетоксического действия композиций во всех дозах.

3.3.1. Угасание рефлекса пассивного избегания

Исследование сохранения памяти оценивалось так же, как в ходе второго этапа после двух курсов введения: короткого (выработка на 6-е сутки введения) и длительного (выработка на 28-е сутки введения). Регистрацию латентного периода до захода в темный отсек фиксировали также через 1, 4 и 8 суток после выработки. Результаты теста представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты теста Угасание рефлекса пассивного избегания

Группа	**Короткий срок введения (6 суток), с**			
Сутки проведения	**6-е сутки**	**7-е сутки**	**10-е сутки**	**14-е сутки**
1 мг/кг винпоцетина	37,7 ± 16,9	170,0 ± 21,1$^{\#\#}$	146,9 ± 69,9* $^{\#\#}$	88,1 ± 81,3***
2,5 мг/кг винпоцетина	61,6 ± 10,4	132,1 ± 70,3$^{\#\,\#\#}$	77,7 ± 88,2***	77,4 ± 88,4$^{\#}$
5 мг/кг винпоцетина	73,2 ± 22,1	145,4 ± 72,9$^{\#\#}$	131,5 ± 68,3* $^{\#\#}$	89,3 ± 78,8 ^{A}
25 мг/кг винпоцетина	48,6 ± 3,3	147,3 ± 68,9$^{\#\#}$	95,8 ± 76,8	49,0 ± 69,3*** $^{\#}$
1 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	56,7 ± 6,3	18,0 ± 16,4 *$^{\#\#}$ **	14,8 ± 13,4** $^{\#\#}$	93,8 ± 92,2
2,5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	42,4 ± 12,6	150,8 ± 61,6$^{\#\#}$	124,4 ± 71,7 *	81,2 ± 85,1***$^{\#}$
5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	40,4 ± 21,9	148,5 ± 66,4* $^{\#\#}$	147,0 ± 69,7* $^{\#\#}$	145,6 ± 72,5$^{\#\#}$ ***
25 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	65,4 ± 39,6	120,4 ± 77,1	90,1 ± 79,1	53,3 ± 67,9$^{\#}$
контрольная	78,4 ± 9,0	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$	119,6 ± 78,0	150,1 ± 63,1$^{\#\#}$
интактная	53,8 ± 35,7	114,1 ±85,1$^{\#\#}$	63,8 ± 72,1 ***	50,1 ± 69,7
Группа	**Длительный срок введения (28 суток)**			
Сутки проведения	**28-е сутки**	**2е сутки**	**32-е сутки**	**36-е сутки**
1 мг/кг винпоцетина	41,5 ± 13,3	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$	180,0 ± 0,0* $^{\#\#}$	180,0 ± 0,0$^{\#\#\,A}$
2,5 мг/кг винпоцетина	15,9 ± 10,2 ^{A}	137,4 ± 57,1$^{\#\,\#\#}$	129,3 ± 73,0$^{\#\#}$	126,3 ± 74,8$^{\#\,\#\#\,A}$
5 мг/кг винпоцетина	71,8 ± 26,3	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$	156,2 ± 50,3$^{\#\#}$	124,2 ± 72,8$^{\#\,\#\#\,A}$
25 мг/кг винпоцетина	31,4 ± 21,3 ^{A}	149,5 ± 64,3$^{\#\#}$	148,6 ± 66,2$^{\#\#}$	180,0 ± 0,0$^{\#\#\,A}$
1 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	44,6 ± 34,4	180,0 ± 0,0 $^{\#\#\,A}$	180,0 ± 0,0 $^{\#\#\,A}$	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$ **

Продожение таблицы 13

Группа	**Длительный срок введения (28 суток)**			
Сутки проведения	**28-е сутки**	**2е сутки**	**32-е сутки**	**36-е сутки**
2,5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	39,6 ± 19,4	124,7 ± 71,6$^{\#\,\#\#}$	130,2 ± 65,3$^{\#\#}$	163,0 ± 35,8$^{\#\#\,A}$
5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	95,1 ± 66,4$^{\#}$	145,6 ± 72,6* $^{\#\#}$	149,6 ± 64,0$^{\#\#}$	146,6 ± 70,5$^{\#\#}$
25 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	76,8 ± 39,6	147,2 ± 69,2$^{\#\#}$	164,2 ± 33,4$^{\#\#}$	124,3 ± 73,7$^{\#\,\#\#}$
контрольная	65,4 ± 36,2	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$	162,8 ± 36,2$^{\#\#}$	180,0 ± 0,0$^{\#\#}$
интактная	51,6 ± 42,8	180 ± 0,0$^{\#\#}$	126,6 ± 69,1$^{\#\#\,A}$	155,6 ± 51,4$^{\#\#\,A}$
Примечание. * – достоверно отличается от интактной группы (p > 0,05); ** – достоверно для группы, получавшей смесь по отношению группы, получавшей только винпоцетин (p > 0,05); $^{\#}$ – достоверно отличается от контрольной группы; $^{\#\#}$ – достоверно относительно значений при выработке; *** – достоверно относительно показателя предыдущей проверки; ^{A} – достоверно отличается от значения показателя после короткого курса введения.				

Контрольная и интактная группы спустя сутки после выработки рефлекса демонстрировали достоверно значимую задержку в светлой камере в обеих частях эксперимента. Это свидетельствует о формировании и сохранении условного рефлекса и подтверждает приемлемость выбранной методики для поставленных задач (Рисунок 8).

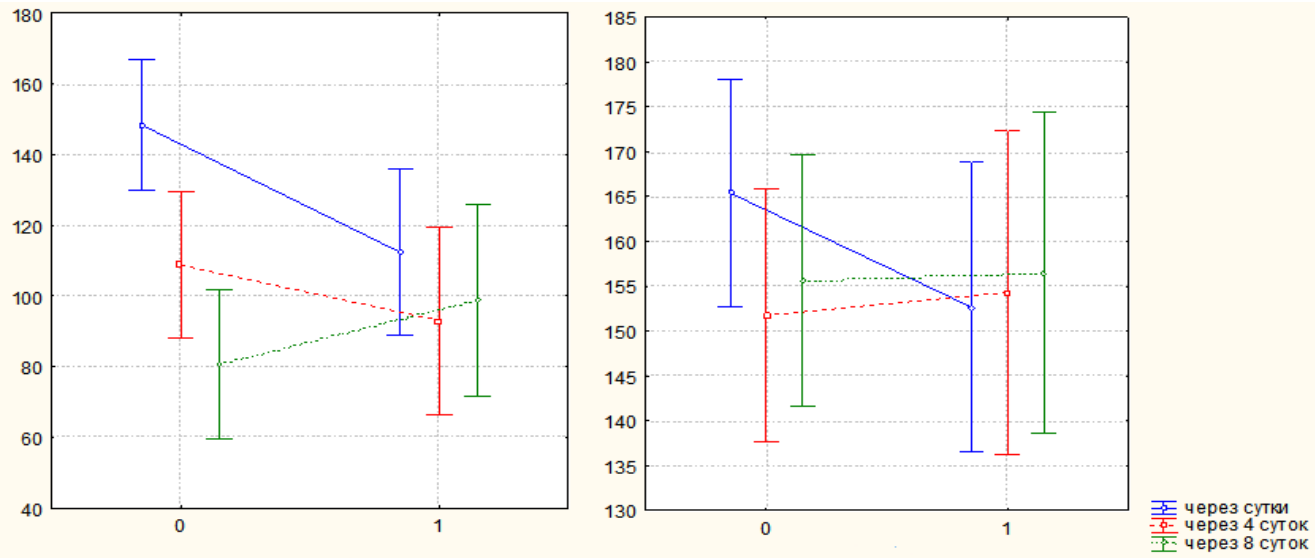


Рисунок 8 – Оценка влияния экстракта гинкго методом дисперсного анализа, главные эффекты [по оси ординат отложены группы, не получавшие экстракт (0) и получавшие экстракт в дозе 16 мг/кг (1)]. По оси абсцисс время в световой камере в секундах

Зафиксировано значимое увеличение периода до захода в темный отсек практически во всех опытных группах на протяжении первых и четвертых суток после выработки рефлекса. Сравнение групп, получавших винпоцетин в одинаковой дозе, показывает различия за исключением комбинации экстракта с 1 мг/кг винпоцетина после короткого курса и экстракта с 25 мг/кг винпоцетина после длительного курса.

Для облегчения интерпретации анализа был проведен дисперсионный факторный анализ влияния экстракта на продолжительность латентного периода. Анализ главных эффектов после короткого и длительного курсов приведен на рисунке 9. Анализ выявил, что значимое негативное влияние объясняется вкладом сочетания экстракта с винпоцетином в дозе 1 мг/кг. Остальные дозы не оказывали значимого влияния на сохранение рефлекса.

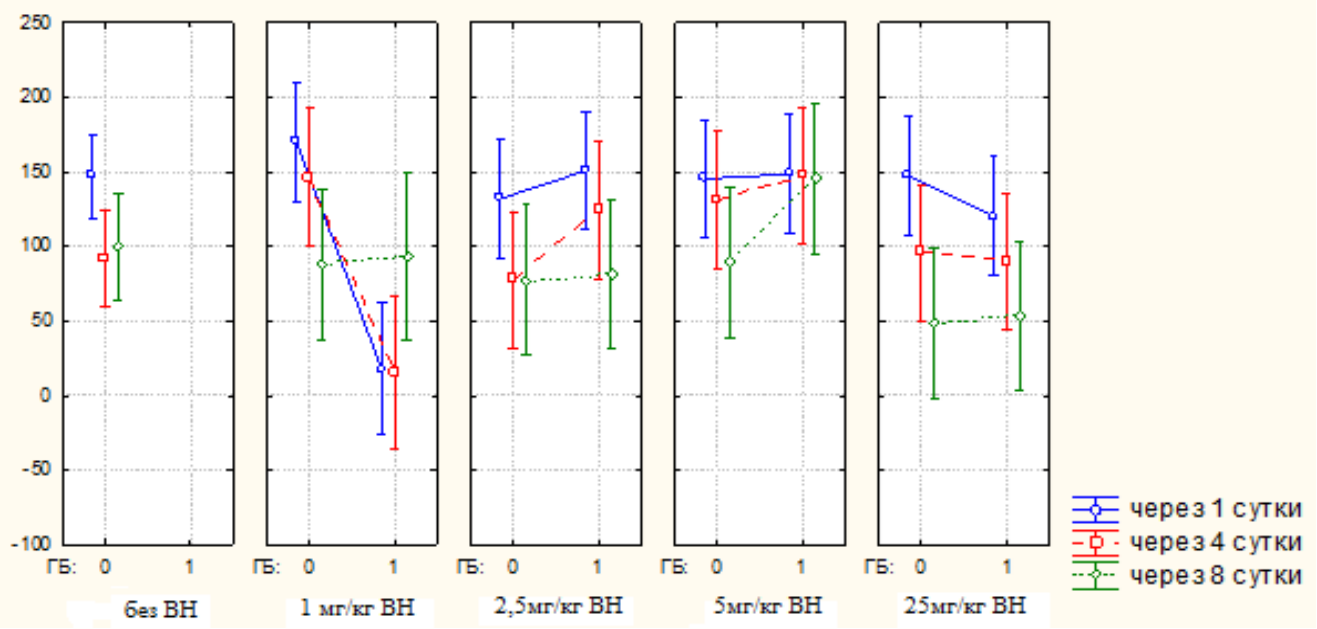


Рисунок 9 – Влияние экстракта гинкго на продолжительность латентного периода в тесте УРПИ после короткого курса введения: 0 – без экстракта гинкго, 1 – с экстрактом гинкго

После длительного курса введения негативное влияние экстракта выявлялось только на 8-е сутки проверки после введения его в сочетании с 25 мг/кг винпоцетина. Остальные изменения были незначимы (Рисунок 10).

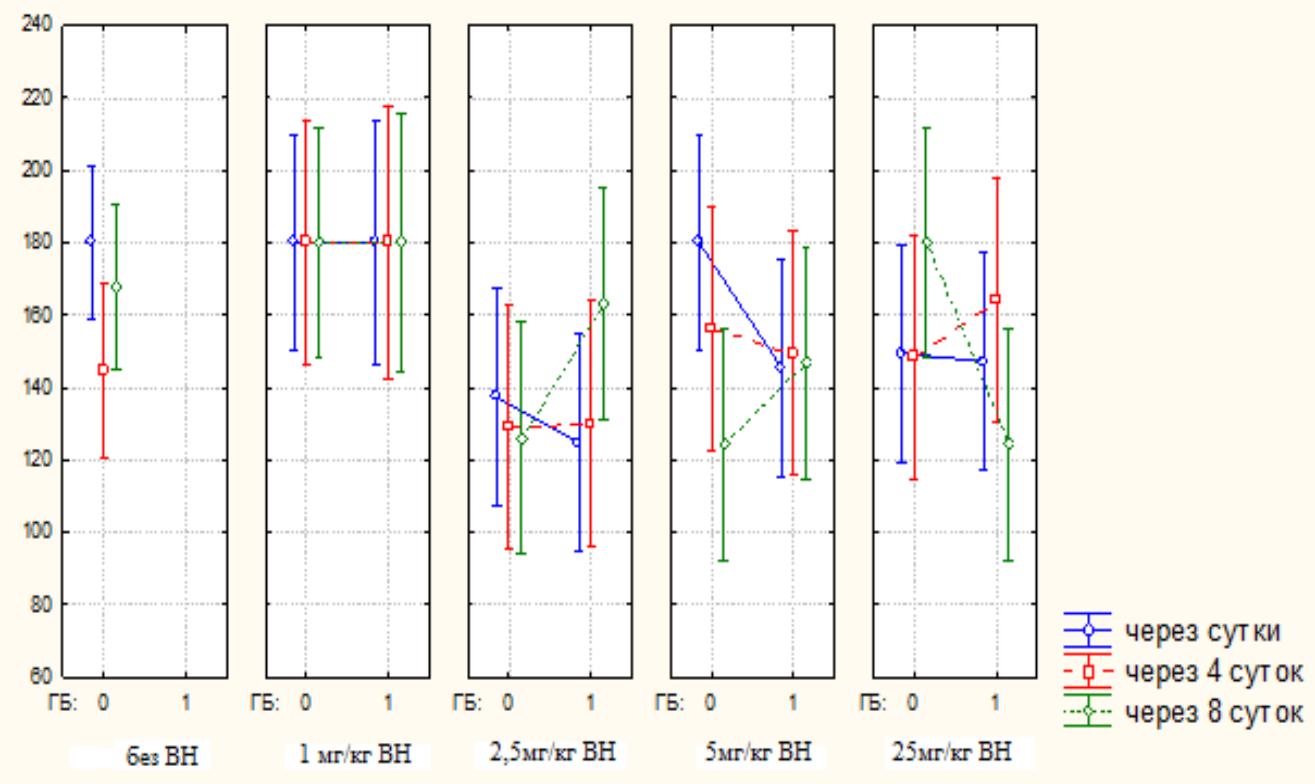


Рисунок 10 – Влияние экстракта гинкго на продолжительность латентного периода в тесте УРПИ после длительного курса введения: 0 – без экстракта гинкго, 1 – с экстрактом гинкго

Поэтому можно сделать вывод об отсутствии влияния экстракта гинкго на сохранение памятного следа. Однако помимо экстракта гинкго влияние на сохранение рефлекса может оказывать винпоцетин. Для избежания влияния провели анализ вклада винпоцетина в сохранение памятного следа методом ANOVA (Рисунки 11 и 12). Из графиков очевидно положительное влияние винпоцетина на сохранение памятного следа в дозе 5 мг/кг после короткого курса применения и в дозе 1 мг/кг после длительного курса применения. Однако данный эффект не значим по сравнению с контрольной и интактной группами при этом анализе.

Вместе с тем полученные данные позволяют предположить положительное влияние на сохранение памяти винпоцетина в дозе 1 мг/кг при применении около 1 месяца, а также отсутствие негативного влияния на память сочетания экстракта гинкго с винпоцетином.

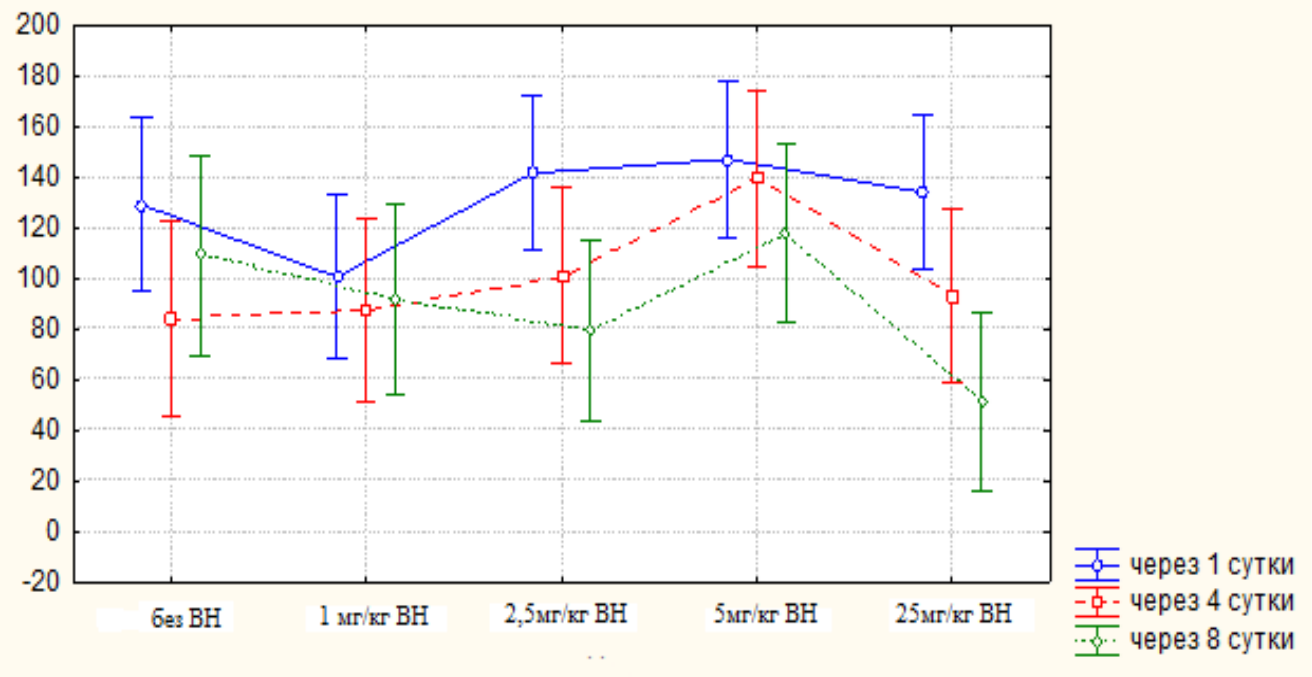


Рисунок 11 – Влияние самого винпоцетина после короткого курса введения. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), оценка главных эффектов

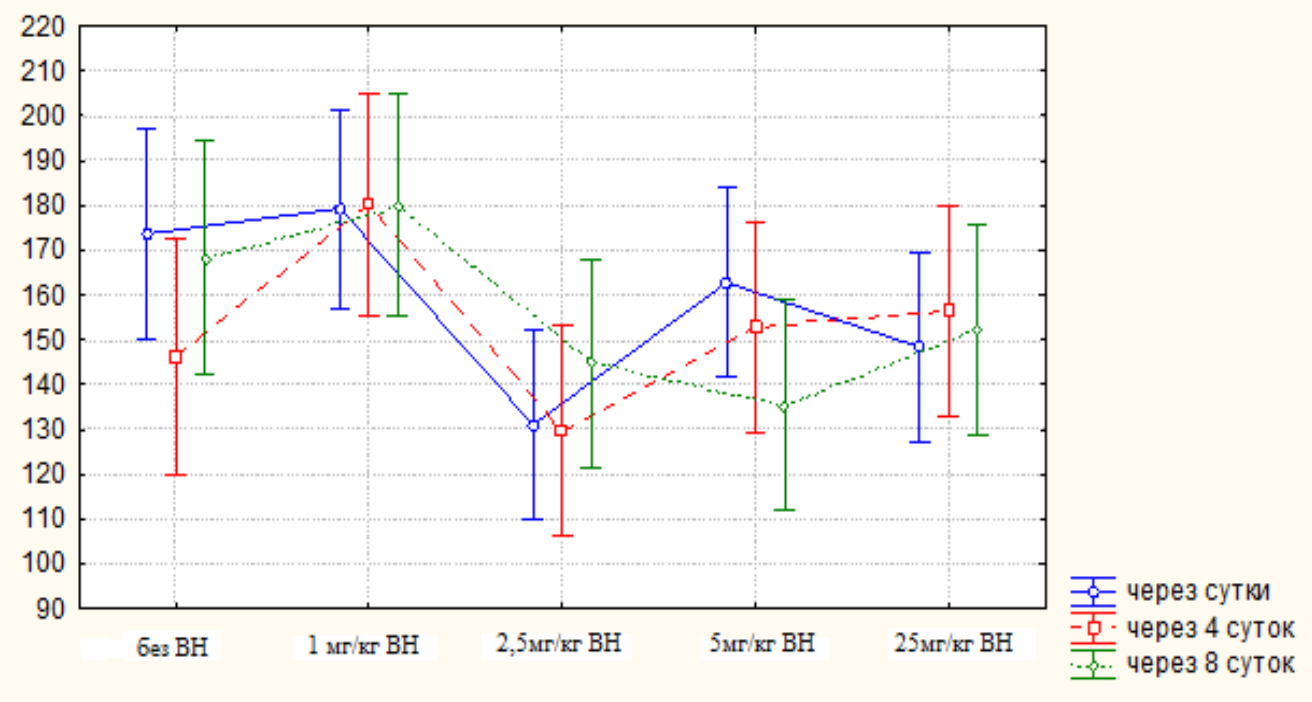


Рисунок 12 – Влияние длительного введения винпоцетина на угасание реакции пассивного избегания. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), оценка главных эффектов

3.3.2. Статическая работоспособность

При сравнении интактной и контрольной группы не было выявлено достоверных различий, что позволяет сделать вывод о приемлемости выбранной методики (Таблица 14). Наблюдаемое на 5-е сутки введения раствора крахмала повышение работоспособности в контрольной группе сопровождалось снижением периода нахождения на сетке у интактной группы на данный срок наблюдения, хотя отличие групп было незначимо.

Таблица 14 – Влияние композиций спустя различные периоды введения на статическую работоспособность крыс

Группа	До	14-е сутки	48-е сутки	64-е сутки	82-е сутки
1 мг/кг винпоцетина	60 ± 32	55 ± 33 (91,7 %)	51 ± 32 (85,3 %)	51 ± 32 (85,3 %)	34 ± 22*** # (66,0 %)
2,5 мг/кг винпоцетина	142 ± 14*	95 ± 96 (66,8 %)	45 ± 14 (31,5 %)	65 ± 56# (45,6 %)	35 ± 35*** (78,9 %)
5 мг/кг винпоцетина	93 ± 44	74 ± 33 (79,2 %)	64 ± 44 (68,7 %)	64 ± 44 (68,7 %)	54 ± 38*** (84,4 %)
25 мг/кг винпоцетина	66 ± 78	143 ± 63* (217,9 %)	67 ± 68 (102,1 %)	56 ± 50 (85,6 %)	
1 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	58 ± 56	65 ± 27 (112,1 %)	78 ± 56 (133,6 %)	78 ± 56 (133,6 %)	55 ± 33***, # (71,3 %)
2,5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	128 ± 100*	129 ± 94* (100,8 %)	122 ± 100* (95,2 %)	123 ± 100# (95,2 %)	97 ± 127*** # (79,3 %)
5 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	67 ± 18	73 ± 47 (110,2 %)	32 ± 18 (48,6 %)	32 ± 18 (48,6 %)	35 ± 30* (106,8 %)
25 мг/кг винпоцетина с экстрактом гинкго	160 ± 88*	115 ± 47*,**, ## (72,0 %)	65 ± 51** (40,8 %)	74 ± 57 (46,1 %)	
Интактная	37 ± 13	35 ± 20 (94,1 %)	29 ± 14 (77,8 %)	23 ± 9 (61,6 %)	19 ± 9*** (64,6 %)
Контрольная	57 ± 24	62 ± 33 (108,4 %)	38 ± 24 (66,4 %)	38 ± 24 (66,4 %)	27 ± 19*** (70,5 %)

Примечание. * – достоверно отличается от контрольной группы ($p > 0,05$); ** – достоверно для группы, получавшей смесь по отношению группы, получавшей только винпоцетин ($p > 0,05$); # – достоверно отличается от интактной группы; ## – достоверно относительно значений до введения; *** – достоверно относительно показателей до введения нитрита натрия ($p > 0,05$).

Достоверное различие относительного значения показателя в группах, получавших винпоцетин и смесь винпоцетина с экстрактом гинкго только при введении винпоцетина в дозе 25 мг/кг. Отдельно винпоцетин в данной дозе

при коротком введении вызывал резкое повышение работоспособности, однако на 48-е сутки она снижалась практически до исходного уровня. При отдельном рассмотрении данного факта можно предположить как повышение работоспособности, так и положительное влияние винпоцетина на ориентирование животных в неизвестных условиях.

Сравнение относительных показателей опытных групп позволяет выделить несколько тенденций. Во-первых, винпоцетин в дозах 1, 2,5 и 5 мг/кг приводил к снижению продолжительности удерживания животных на сетке после обоих сроков введения. Во-вторых, введение смесей с экстрактом в течение пяти дней поддерживало статическую работоспособность на исходном уровне. В-третьих, после длительного срока введения практически во всех группах наблюдалось снижение продолжительности периода до падения животного. Только группа, получавшая винпоцетин в дозе 1 мг/кг с добавлением экстракта гинкго, после длительного курса применения композиции продемонстрировала значимое увеличение периода нахождения на сетке.

При сравнении этих тенденций обращает на себя внимание различие в группах, получавших только винпоцетин, по сравнению с группами, получавшие те же дозы винпоцетина вместе с экстрактом. Группы, получавшие смеси винпоцетина в дозах 1, 2,5 и 5 мг/кг с экстрактом гинкго, после короткого периода введения демонстрировали увеличение работоспособности. В то же время все группы, получавшие только винпоцетин, кроме группы с дозой 25 мг/кг, демонстрировали снижение работоспособности. После длительного курса снижение работоспособности происходило во всех группах, кроме получавших винпоцетин в дозе 25 мг и смесь экстракта с 1 мг/кг винпоцетина. Причем добавление экстракта гинкго к винпоцетину в дозах 1 и 2,5 мг приводило к увеличению работоспособности по сравнению с группами, получавшими соответствующие дозы винпоцетина без экстракта.

Увеличение периода может быть вызвано повышением работоспособности, однако особенность методики может приводить к возникновению у животных страха падения. Поэтому снижающие тревожность вещества могут уменьшать

время до падения за счет принятия животным падения как выхода из дискомфортной ситуации.

После введения нитрита натрия на 82-е сутки во всех группах наблюдалось снижение времени удерживания на решетке. Вместе с тем у групп, получавших винпоцетин в комбинации с экстрактом гинкго, изменение было значительным.

Отсюда добавление к винпоцетину экстракта листьев гинкго способствует повышению статической работоспособности крыс. Причем при введении винпоцетина в дозе 1 мг/кг наблюдается стойкий положительный эффект на протяжении более 60 дней. После гипоксического воздействия комбинации с экстрактом способствовали поддержанию более высоких показателей работоспособности.

3.3.3. Влияние на эмоционально-стрессовое состояние в тесте принудительного плавания

Общепринятый тест отчаяния применялся для оценки изменения поведенческих реакций животных в экстремальной ситуации. Длительность и частота периодов иммобилизации отражают уровень депрессивно-подобного поведения животного. Известно, что вещества группы антидепрессантов увеличивает количество попыток и повышает их продолжительность.

Продолжительность периода иммобилизации можно принять как меру тревожности животного. Результаты, полученные в эксперименте, приведены на рисунке 13.

При сравнении результатов контрольной и опытной группы, очевидным становится более высокие значения показателей в контрольной группе (различия не достоверны по критериям для непараметрических методов). В контрольной группе наблюдалась самая высокая продолжительность периода активности. Тогда повышение ее у контрольной группы свидетельствует о более низкой тревожности крыс. Снижение тревожности в контрольной группе может быть вызвано определенной адаптацией животных к факту введения как к хроническому стрессорному воздействию.

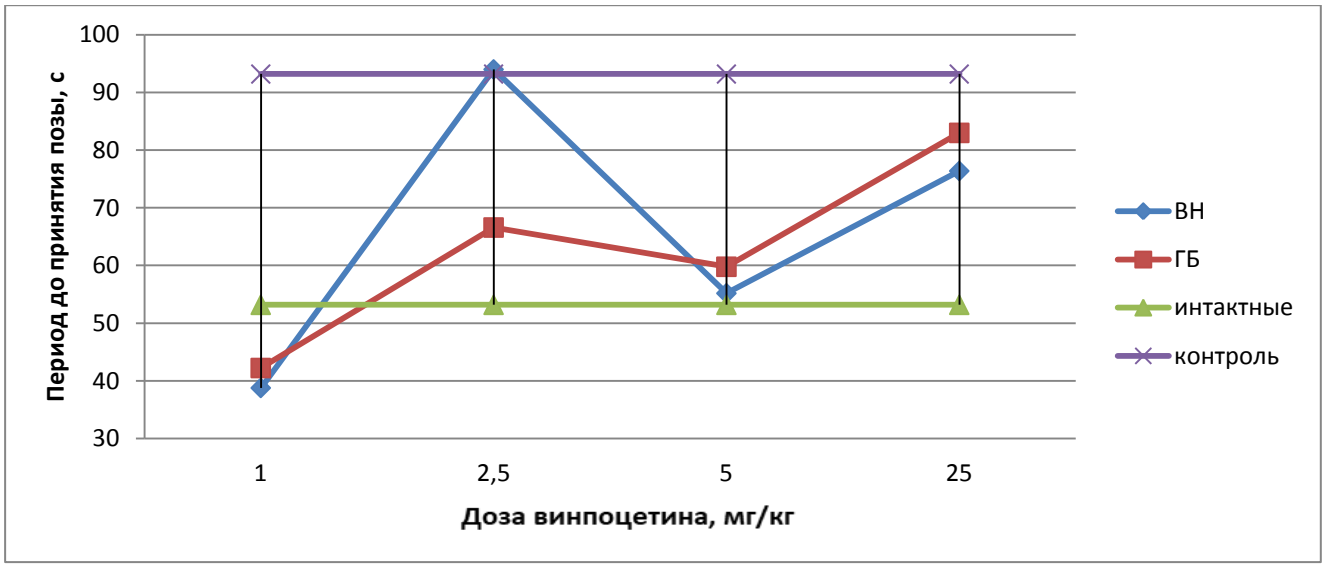


Рисунок 13 – Продолжительность периода до принятия характерной позы в секундах в тесте принудительного плавания

После введения различных доз винпоцетина отдельно и в смеси винпоцетина с экстрактом гинкго время принятия характерной позы не превышало уровня значений у контрольной группы. Однако наблюдалась тенденция к увеличению периода до наступления отчаяния у крыс опытных групп. Вместе с тем в случае 2,5 мг/кг винпоцетина и его смеси в той же дозе с экстрактом гинкго наблюдалось повышение времени до принятия животными характерной позы. Винпоцетин в дозе 2,5 мг/кг оказывал наиболее большой эффект на продолжительность данного периода среди всех опытных групп.

Однако неоднородность групп по изменению массы животного позволяет предположить влияние данного показателя. Поэтому полученные данные были приведены к массе. С этой целью умножим каждое значение на коэффициент, равный отношению массы крысы к ориентировочной массе (400 г). Полученные после приведения данные представлены на рисунке 14.

После приведения значений к массе становиться очевидным различия во влиянии винпоцетина и его смесей с экстрактом гинкго. Так, при введении дозы 25 мг/кг, добавление экстракта достоверно повышает продолжительность периода активности крыс группы, которая получала только винпоцетин. Остальные значения не имели достоверных отличий.

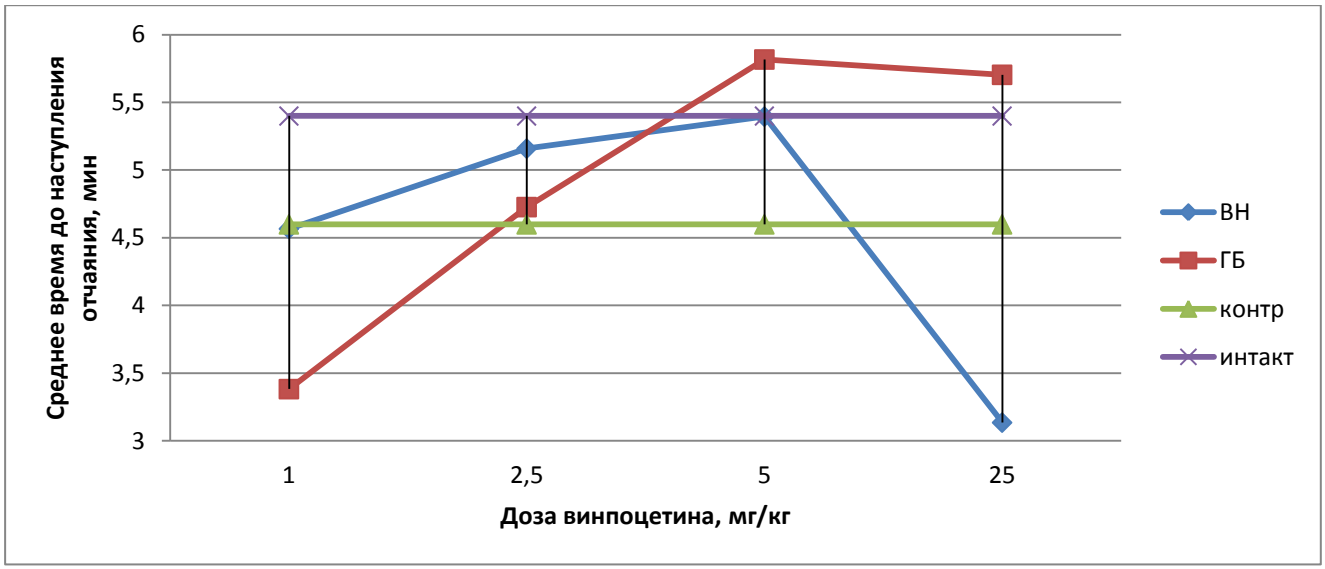


Рисунок 14 – Среднее время до принятия характерной позы в группах с учетом массы животных

Вместе с тем наблюдается тенденция к повышению периода сопротивления с возрастанием дозы винпоцетина у групп, получавших смеси его с экстрактом. Сравнение группы, получавшей 25 мг/кг винпоцетина, и группы, получавшей ту же дозу экстракта, показывают значимое превосходство вследствие резкого снижения периода у группы, получавшей только винпоцетин.

Помимо продолжительности периода до принятия характерной позы, противотревожное действие характеризует количество попыток выбраться, предпринимаемых животным за время испытания. Как видно из рисунка 15, винпоцетин и его смеси увеличивали среднее количество попыток в группе. Однако винпоцетин в дозе 25 мг/кг приводил к снижению данного показателя. Введение же в композицию экстракта приводило к увеличению периода, причем разница между этими показателями была значима.

В результате было выявлено увеличение относительной продолжительности периода активности крыс. Также выявлено увеличение количества попыток активно избежать неприятного воздействия в группе, получавшей комбинацию экстракта с 5 мг/кг винпоцетина. Таким образом, можно сделать предположение о положительном влиянии комбинации винпоцетина с экстрактом гинкго на поведение животных в условиях неизбежной угрожающей ситуации.

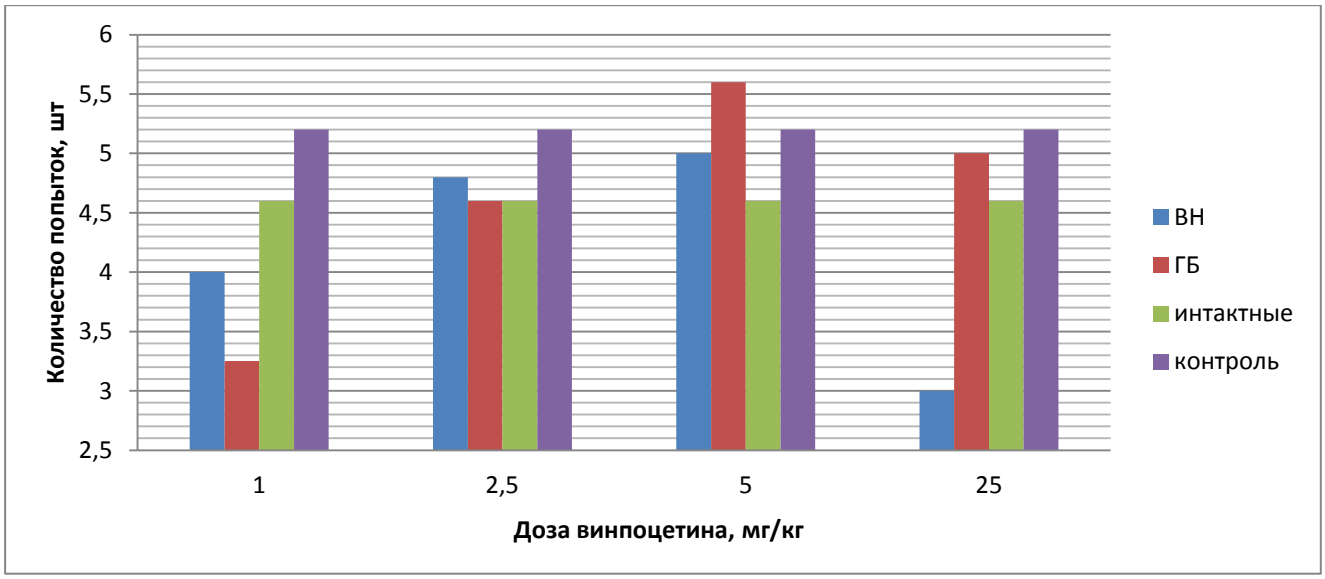


Рисунок 15 – Среднее количество попыток выбраться в группе в тесте принудительного плавания

3.4. Исследования безопасности композиции: влияние сочетания на характеристики крови экспериментальных животных

После проведения фармакологических исследований у крыс забирали кровь из сердца под общим наркозом. Полученные образцы использовали для определения показателей липидного, белкового обменов, а также общих биохимических показателей и картины крови. Значимые изменения были зафиксированы для показателей альфа-амилазы (Рисунок 16), аспартатаминотрансферазы (АсТ, рисунок 17), общего холестерина (Рисунок 18) и глюкозы (Рисунок 19).

Снижение активности альфа-амилазы (Рисунок 16) описывается как часть действия флавоноидов: флавоноиды и дубильные вещества связывают молекулы альфа-амилазы, снижая её активность *in vivo* [127]. Достоверное снижение активности наблюдается для всех групп как получавших винпоцетин один, так и вместе с экстрактом гинкго. При этом АсТ значимо снижался для группы, получавшей винпоцетин в дозе 2,5 мг/кг (соотношение винпоцетина к экстракту гинкго 1:6,4, рисунок 17).

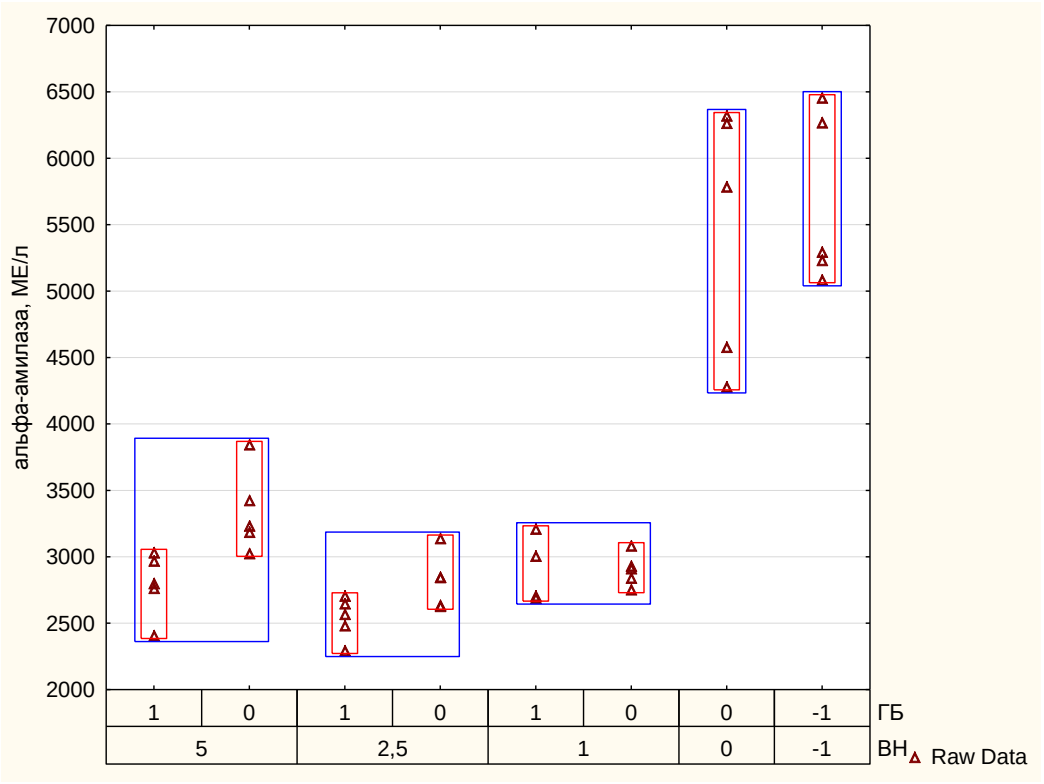


Рисунок 16 – Зависимость активности альфа-амилазы (МЕ/л) от дозы винпоцетина и наличия экстракта гинкго. -1 обозначена интактная группа

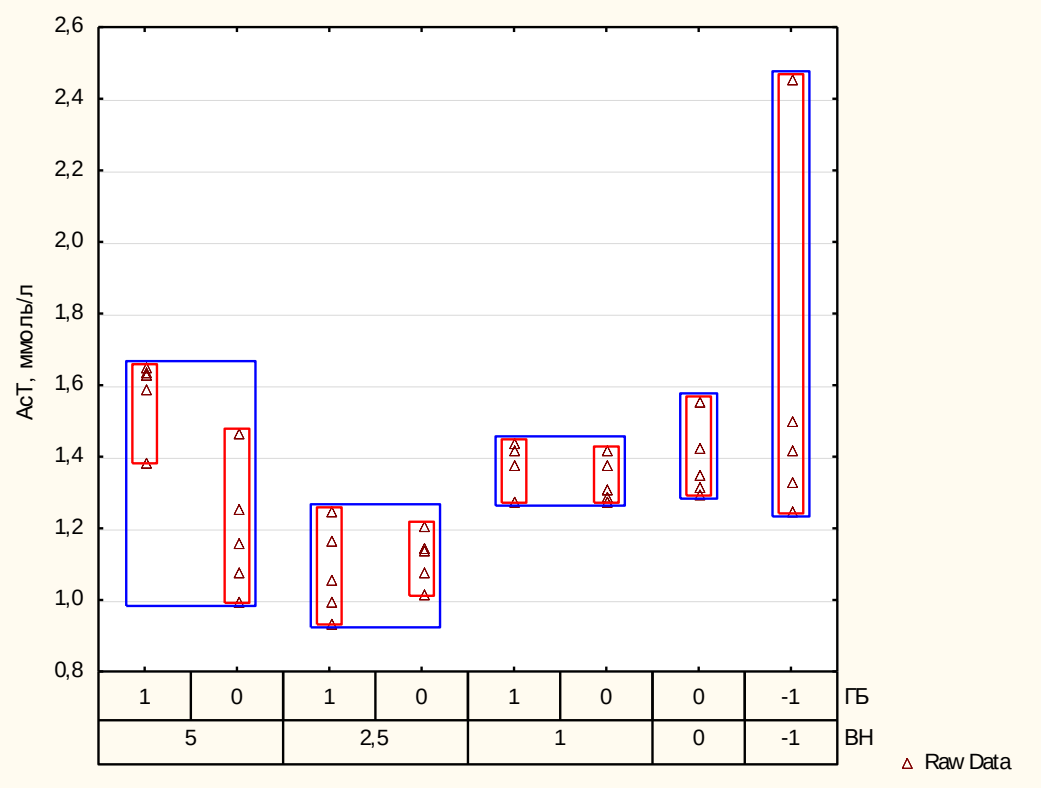


Рисунок 17 – Влияние применения винпоцетина и/или экстракта гинкго на уровень АсТ. -1 обозначена интактная группа

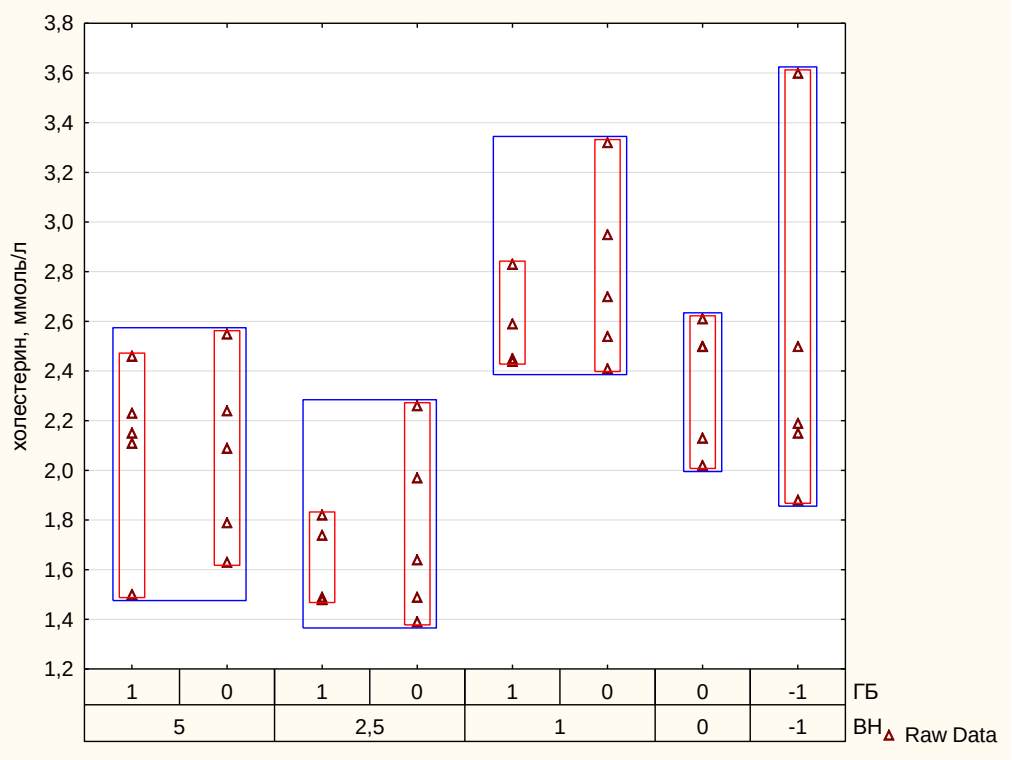


Рисунок 18 – Влияние введение винпоцетина и/или экстракта гинкго на уровень общего холестерина. -1 обозначена интактная группа

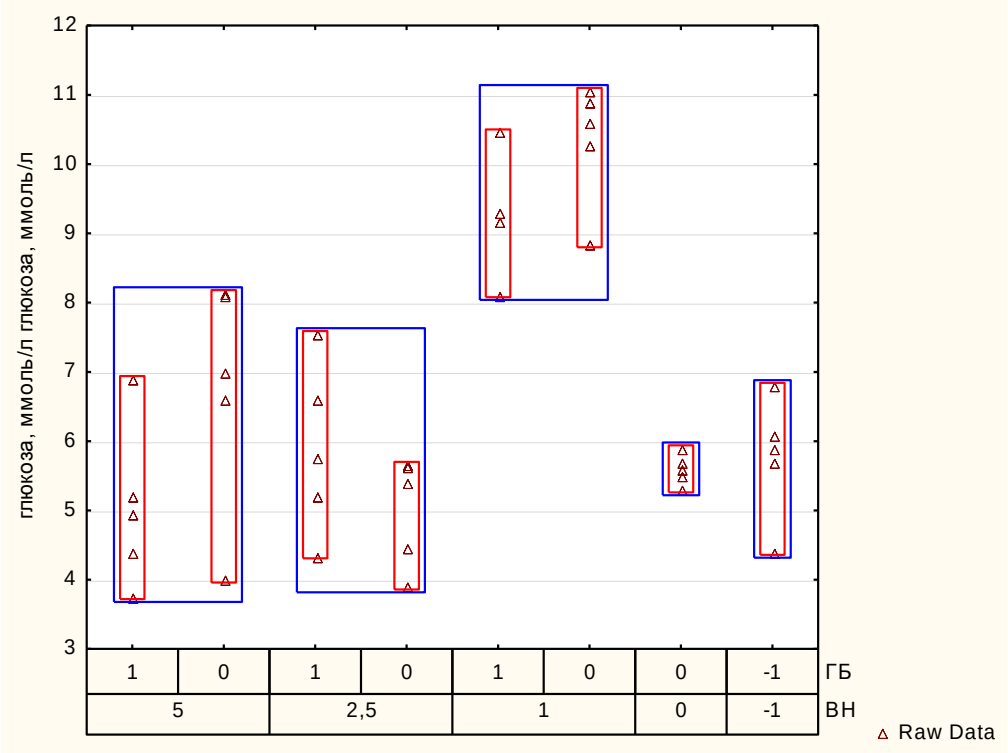


Рисунок 19 – Изменение уровня глюкозы на животных после введения винпоцетина и/или экстракта гинкго. -1 обозначена интактная группа

Также для низких концентраций винпоцетина характерно достоверное снижение уровня общего холестерина [в дозе 2,5 мг/кг (соотношение винпоцетина к экстракту гинкго 1:6,4, рисунок 18]. Ранее было показано, что винпоцетин способен модулировать экспрессию ядерных рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами типа гамма (PPAR-γ) в гепатоцитах [128] и угнетать аккумуляцию холестерина в макрофагах [129]. Отсутствие изменений уровня холестерина при низких дозах объясняется метаболическим порогом активации PPAR-зависимых генов.

Сравнение данных уровня глюкозы (Рисунок 19) обнаружило достоверное повышение уровня глюкозы после введения низких доз винпоцетина. Данный эффект видимо связан с недостаточной дозой винпоцетина.

Пересчет дозы на человека проводили для оптимального соотношения винпоцетин : экстракт гинкго 1:6,4. Исходя из дозы винпоцетина в таблетках для приема внутрь 5–10 мг, при пересчете доз из экспериментов по площади поверхности кожи получили дозу 10 мг при трехкратном приеме. Тогда оптимизированное соотношение активных ингредиентов 10 мг винпоцетина и 64 мг экстракта гинкго. Соотношение ингредиентов защищено патентом РФ [5], титульный лист патента приведен в Приложении В.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

В результате проведенных исследований выявлена способность сочетания экстракта гинкго и винпоцетина в дозе 1 мг/кг увеличивать статическую работоспособность. Также предположено положительное влияние на сохранение памяти после введения винпоцетина в дозе 1 мг/кг при применении около 1 месяца, а также отсутствие негативного влияния на память сочетания экстракта гинкго с винпоцетином. Комбинация экстракта с винпоцетином в дозах 5 и 25 мг/кг повышали количество попыток избежать неприятную ситуацию в тесте принудительного плавания, а также повышали относительное время

активности животных в данном тесте. Все исследованные комбинации винпоцетина с экстрактом гинкго способствовали снижению внутривидовой агрессивности относительно уровня у групп, получавших только винпоцетин в соответствующих дозах.

Таким образом, комбинация винпоцетина в дозе от 1 до 5 мг/кг с экстрактом гинкго в дозе 16 мг/кг обладает положительным влиянием на некоторые показатели высшей нервной деятельности животных и может быть интересной в качестве основы для создания нового лекарственного препарата. Дозировка 5 мг/кг и более обладает положительным влиянием на обмен жиров и углеводов. Оптимальным соотношением в таком случае будет отношение 1 к 6,4 винпоцетина и экстракта гинкго соответственно, что стало основой композиции.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОМПОЗИТНОГО ПРЕПАРАТА В ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ФОРМЕ НА ОСНОВЕ СМЕСИ ЭКСТРАКТА ГИНКГО И ВИНПОЦЕТИНА

4.1. Выбор технологии получения таблетированной формы, содержащей экстракт гинкго и винпоцетин

По результатам разработанной третьей главы был определен состав активных компонентов для введения в одну таблетку винпоцетина 10 мг и экстракта гинкго. В качестве формы была выбрана таблетка 9 мм так как для преодоления расслоения таблеток и налипания на пуансоны необходимо добавить значительное количество вспомогательных веществ в соотношении минимум 1:2 или 1:3. Это выводит общую массу таблетки на уровень 250–300 мг [130, 131]. Исследования по созданию готовой таблетированной формы было разделено на 4 этапа (Рисунок 20).

Этап 1	Состав для прямого прессования		
	Прямое смешивание	Сыпучесть таблет. масс	Образцы 1–5
Этап 2	Выбор наполнителя, дезинтегранта и связующего		
	Влажное гранулирование	Функция желательности	Образцы 6–21
Этап 2.1	Оптимизация высвобождения винпоцетина		
	Влажное гранулирование с разными составами наполнителя	Растворение (экспресс-метод)	Образцы 22–25
Этап 2.2	Оптимизация состава по насыпной плотности и растворению		
	Влажное гранулирование Смеси МКЦ/ГПЦ	Растворение Насыпная плотность	Образцы 26–34

Рисунок 20 – Последовательность разработки состава готовой таблетированной формы

Поскольку для прямого прессования критически важны свойства таблеточной массы, в частности сыпучесть, основным откликом в первом этапе выбрана сыпучесть получаемых таблеточных масс для прямого прессования. В качестве сравнения использовали гранулирование смеси действующих веществ (экстракт гинкго и винпоцетин) с добавлением разного количества МКЦ. Вторым этапом определяли наиболее подходящие вспомогательные вещества из групп наполнитель, дезинтегрант и связующее вещество для получения таблеток методом влажного гранулирования. С целью получения наиболее полной информации использовали планирование эксперимента по греко-латинскому квадрату, а приемлемость состава оценивали через обобщенную функцию желательности Харрингтона. Третьим этапом выбранные составы оптимизировали по скорости высвобождения винпоцетина в экспресс-тесте высвобождения. Выбор винпоцетина обусловлен положением ОФС.1.4.2.0014 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Сравнительные данные о растворимости субстанций приведены в Приложении Г.

4.2. Проверка пригодности прямого прессования

Для проверки приемлемости прямого прессования рассматривали наиболее распространенные наполнители, повышающие сыпучесть. Исходя из предполагаемого состава лекарственной формы в качестве составов для предварительной оценки сыпучести были выбраны значения, указанные в столбце 3 таблицы 15.

Использование маннита и лактозы приводило к сводообразованию (крайне плохая сыпучесть). Использование МКЦ марки 102 без гранулирования не повышало сыпучесть, при этом увеличивалось время распадаемости таблетки. Добавление аэросила к смеси действующих веществ в предельном количестве 10 % также не повышало сыпучесть смеси. В результате ни один из выбранных наполнителей не увеличивал сыпучесть массы выше уровня 3 г/с.

Таблица 15 – Влияние наполнителей для прямого прессования на реологические свойства смесей

Образец	**Наименование вспомогательного вещества**	**Доля, %**	**Сыпучесть, г/с**
1	МКЦ, без гранулирования	50	0,26 ± 0,02
2		75	0,55 ± 0,03
3	Силилированная МКЦ (Prosolv® SMCC 90)	50	0,31 ± 002
4	МКЦ, ***гранулирование***	50	6,3 ± 0,20*
5	Гидрофобный аэросил	10	1,0 ± 0,05
Примечание – * После 40 минут в тесте «Распадаемость» были остатки таблеток на сетке.			

По данным некоторых публикаций фармацевтических компаний смешанные наполнители могут преодолеть как низкую сыпучесть таблеточных масс, так и цементирование в таблетированной форме [132]. В наших исследованиях был проведен ряд опытов по изучению сыпучести комбинации винпоцетина и экстракта гинкго с силилированной микрокристаллической целлюлозой (Prosolv® SMCC 90). Однако вопреки некоторым публикациям, сыпучесть была хуже, чем при использовании в качестве наполнителя МКЦ (Таблица 15).

Так как повысить сыпучесть таблеточной массы за счет использования наполнителей в приемлемых соотношениях не удалось, использование прямого прессования оказалось нецелесообразным и труднореализуемым. Поэтому решено было использовать способ влажного гранулирования. Влажное гранулирование смеси действующих компонентов с МКЦ марки 101 водой приводило к повышению сыпучести до удовлетворительной (Таблица 15, образец 4). Однако полученные таблетки не удовлетворяли требованиям по показателю «Распадаемость»: за 40 минут на решетке оставались плотные ядра всех таблеток.

4.2.1. Уточнение структуры винпоцетина в монокристалле методом рентгеноструктурного анализа (РСА)

Низкая смачиваемость поверхности таблетки критически замедляет проникновение воды в ее поры и ухудшает адгезию, что приводит к задержке распадаемости таблетки, падению биодоступности вещества и браку при нанесении защитных пленочных оболочек [133]. Наблюдаемая низкая смачиваемость таблеток, полученных из гранулята, вероятнее всего была связана со свойствами экстракта листьев гинкго (гидрофобность, способность к ослизнению) [134]. Вместе с тем вклад винпоцетина также нельзя исключить, поскольку данное вещество способно образовать трудно растворимые агломераты, одним из методов описания структур, которых является рентгеноструктурный анализ. Поскольку в ходе технологического процесса явления спонтанной перекристаллизации, а, следовательно, и изменение параметров высвобождения данного компонента из формы исключить нельзя, то интерес представляло изучение структуры кристалла винпоцетина после спонтанной перекристаллизации.

Ранее структура винпоцетина была описана в работе [135] на основе данных рентгеноструктурного анализа (РСА) с фактором расходимости (R-фактор) 0,043. Нам удалось получить монокристалл винпоцетина и уточнить структуру методом рентгеноструктурного анализа (Приложение Д). При этом R-фактор оказался немного ниже – 0,036, что свидетельствует о более высокой точности полученных экспериментальных данных.

Кроме того, авторы работы не описывают особенности упаковки молекул винпоцетина в кристалле, что, в свою очередь, представляет интерес для кристаллохимии и позволяет выявить связи строения вещества с его физико-химическими и реологическими свойствами [26]. Отметим, что посредством слабых водородных связей C(21)-H(21B)…O(2) (расстояние D-H…A 2,66 Å, <DHA 121°, расстояние D…A 2,27 Å) молекулы соединения формируют двойные ленты вдоль оси b (Приложение Д).

Укладка структуры винпоцетина соответствует плохой растворимости вещества из-за стабильной модификации. Это подтверждается в работах

по получению сополимеров с борной кислотой, что приводило к повышению растворимости винпоцетина [136]. Также данная упаковка молекул сочетается с флуоресценцией винпоцетина в порошке: по спектрам возбуждения флуоресценции в зоне 360 нм наблюдается минимум в спектре. В то же время порошок флуоресцирует при возбуждении 365 нм. Причиной может быть снижение безизлучательных потерь энергии, а квантовый выход свечения в порошке может быть выше, чем в растворе. Это типично для эффекта **AIE** (Aggregation-Induced Emission) – эмиссия, индуцированная агрегацией [137]. Данный эффект может ухудшать смачиваемость поверхности гранул [129].

Данные РСА позволяют предположить дополнительное негативное влияние процесса перекристаллизации винпоцетина на высвобождение действующих веществ.

4.3. Выбор вспомогательных веществ с использованием методов планирования эксперимента

На втором этапе использовали способ влажного гранулирования. Выбор компонентов проводили на основании плана эксперимента греко-латинский квадрат 4×4. В качестве факторов были выбраны три группы вспомогательных веществ: наполнитель, связующее и разрыхлитель. В качестве уровней первого фактора выбирали наиболее распространенные наполнители: лактоза, маннит и МКЦ марки 101, а также декстраты (Emdex®). В качестве связующего раствора рассматривали воду, 1%-й раствор поливинилпирролидона, 1%-й раствор гидроксипропилметилцеллюлозы и 5%-й крахмальный клейстер. Из-за плохих результатов в тесте «Распадаемость» обязательным ингредиентом был выбран дезинтегрант, в качестве которого рассматривали крахмал картофельный (предварительно высушенный до постоянной массы) натрия карбоксиметилкрахмал, кросповидон (полипласдон-XL и полипласдон XL-10). Дезинтегрант вводили при опудривании гранулята. Массовую долю для ведения

дезинтегранта: по 2 % – для полипласдонов и натрия карбоксиметилкрахмала и 5 % – для картофельного крахмала.

Для уменьшения количества образцов предварительно построили матрицу греко-латинского квадрата путем случайного перемешивания подуровней факторов. Матрица эксперимента приведена в таблице 16.

Т а б л и ц а 1 6 – Матрица случайного распределения образцов

Дезинтегранты		**Наполнители**			
		D	**C**	**B**	**A**
Связующие	**w**	K $_{6}$	N $_{7}$	M $_{8}$	L $_{9}$
	z	L $_{10}$	K $_{11}$	N $_{12}$	M $_{13}$
	x	N $_{14}$	M $_{15}$	K $_{16}$	N $_{17}$
	y	M $_{18}$	L $_{19}$	L $_{20}$	K $_{21}$

П р и м е ч а н и е – Наполнитель: D – МКЦ, C – декстраты, B – маннит, A – лактоза; связующие вещества: w – 5%-й крахмальный клейстер, z – 1%-й раствор ГПМЦ, x – 1%-й раствор ПВП, y – вода; Разрыхлитель: K – кросповидон (полипласдон XL), N – картофельный крахмал, M – натрия карбоксиметилкрахмал, L – кросповидон (полипласдон XL-10).

Согласно предложенному плану изготовили 16 образцов таблеток. Для каждого образца определяли распадаемость, истираемость, среднюю массу таблеток и высоту таблетки (Таблица 17).

Полученные таблетки также не удовлетворяли требованиям по показателю «Распадаемость». Поэтому рассматривали два косвенных показателя распадаемости: долю поглощенной влаги после выдерживания на смоченной поверхности (далее поглощение влаги, %) и не смоченный остаток таблетки после удаления размокшей части таблеток (далее несмоченный остаток, %) для обработки данных эксперимента и выявления наиболее перспективных сочетаний [138].

Таблица 17 – Значения откликов для опытов по плану латинского квадрата

Образец	Наполнитель	Связующий раствор	Дезинтегрант	Средняя масса таблетки, г	Высота таблетки, мм	Сыпучесть, г/с	Истираемость, %	Поглощение влаги, %	Несмоченный остаток, %
6	МКЦ	Клейстер	Кросповидон XL	0,294	3,56 ± 0,01	6,61 ± 0,10	99,50	64,75	0
7	Декстраты	Клейстер	Крахмал	0,295	3,54 ± 0,01	9,71 ± 0,28	99,30	0	89,73
8	Маннит	Клейстер	NaКМК	0,296	3,55 ± 0,01	9,14 ± 0,17	99,50	0,97	94,5
9	Лактоза	Клейстер	Кросповидон XL-10	0,293	3,40 ± 0,02	12,10 ± 1,18	98,60	10,64	0
10	МКЦ	Раствор ГПМЦ	Кросповидон XL-10	0,292	3,60 ± 0,01	7,43 ± 0,27	99,79	47,15	26,11
11	Декстраты	Раствор ГПМЦ	Кросповидон XL	0,299	2,90 ± 0,01	11,49 ± 0,24	92,55	1,37	40,45
12	Маннит	Раствор ГПМЦ	Крахмал	0,297	3,48 ± 0,00	8,62 ± 0,18	94,78	2,25	80,13
13	Лактоза	Раствор ГПМЦ	NaКМК	0,294	3,5 ± 0,01	11,04 ± 0,59	97,00	6,67	45,7
14	МКЦ	Раствор ПВП	Крахмал	0,220	2,98 ± 0,02	7,59 ± 0,72	99,81	7,55	95,49
15	Декстраты	Раствор ПВП	NaКМК	0,295	3,50 ± 0,00	11,60 ± 0,25	98,91	0	86,68
16	Маннит	Раствор ПВП	Кросповидон XL-10	0,295	3,58 ± 0,00	9,40 ± 0,94	99,63	0	96,82
17	Лактоза	Раствор ПВП	Кросповидон XL	0,283	3,33 ± 0,00	11,75 ± 0,86	99,01	2,15	78,79
18	МКЦ	Вода	NaКМК	0,228	2,88 ± 0,01	7,00 ± 0,79	99,65	5,59	96,64
19	Декстраты	Вода	Кросповидон XL-10	0,290	3,52 ± 0,01	12,98 ± 7,38	99,52	0	85,71
20	Маннит	Вода	Кросповидон XL	0,291	3,52 ± 0,01	11,19 ± 1,29	99,55	0	93,4
21	Лактоза	Вода	Крахмал	0,287	3,40 ± 0,02	9,55 ± 0,13	98,50	0	95,82

Отклики, используемые в эксперименте, не равноценны по важности: вводимые новые показатели, значительно уступают фармакопейным и вводятся лишь в рамках одного эксперимента. Поэтому для принятия решения о качестве результата было решено применить функцию желательности. Были приняты следующие произвольные критерии оценок для каждого показателя (Таблица 18).

Таблица 18 – Соответствие номинальных оценок, интервалов функции желательности и значений откликов

Оценка	**Значение функции**	**Сыпучесть, г/с**	**Истираемость, %**	**Поглощение влаги, %**	**Несмоченный остаток, %**
		d_1	**d_2**	**d_3**	**d_4**
Очень плохо	0–0,2	0–3	92–95	0–1	100–90
Плохо	0,2–0,37	3–6	95–97	1–5	90–80
Удовлетворительно	0,37–0,63	6–9	97–98	5–20	80–20
Хорошо	0,63–0,8	9–13	98–99	20–40	20–5
Отлично	0,8–1	13–16	99–100	40–100	5–0

В ходе дальнейшего перехода от физических значений показателей к оценочному, условно принимали линейность зависимости аргумента функции желательности (d_{ni}) на указанных выше интервалах (Таблица 18). Так как важность показателей «Истираемость таблеток» и «Сыпучесть» таблеточной массы являются одинаково значимыми, но такие показатели как поглощения влаги и несмоченный остаток уступают им по значимости и являются характеристиками одного процесса – дезинтеграции. Поэтому при нахождении общего значения функции желательности вначале находили среднее арифметическое двух оценок распадаемости. Формула расчета обобщенного критерия оптимизации приведена ниже:

$$D_i = \sqrt[3]{d_{1i} * d_{2i} * \left[{(d_{3i} + d_{4i})}/{2}\right]}.$$

Дальнейший перевод обобщенного критерия оптимизации в категориальное значение проводился согласно общепринятой шкале. Введение части в квадратных скобках описывает процессы набухания и дезинтеграции таблеток (далее средний арифметический показатель распадаемости). Оценки образцов, выполненных по плану греко-латинского квадрата с помощью функций желательности, обобщенного критерия оптимизации и оценки образцов приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты расчета обобщенного критерия желательности

Образец	**Наполнитель**	**Связующий раствор**	**Дезинтегрант**	d_1	d_2	d_3	d_4	**D**	**Оценка**
6	**МКЦ**	**Клейстер**	**КП* XL**	**0,545**	**0,938**	**0,924**	**0,982**	**0,79**	**Хорошо**
7	Декстраты	Клейстер	Крахмал	0,659	0,900	0,001	0,197	0,39	Удовлетв.
8	Маннит	Клейстер	NaКМК	0,630	0,938	0,178	0,039	0,40	Удовлетв.
9	**Лактоза**	**Клейстер**	**КП* XL-10**	**0,764**	**0,740**	**0,470**	**0,982**	**0,74**	**Хорошо**
10	**МКЦ**	**Раствор ГПМЦ**	**КП* XL-10**	**0,493**	**0,970**	**0,847**	**0,601**	**0,70**	**Хорошо**
11	Декстраты	Раствор ГПМЦ	КП* XL	0,743	0,624	0,207	0,543	0,56	Удовлетв.
12	Маннит	Раствор ГПМЦ	Крахмал	0,592	1,000	0,244	0,365	0,56	Удовлетв.
13	Лактоза	Раствор ГПМЦ	NaКМК	0,723	0,368	0,399	0,521	0,50	Удовлетв.
14	МКЦ	Раствор ПВП	Крахмал	0,503	0,971	0,415	0,023	0,47	Удовлетв.
15	Декстраты	Раствор ПВП	NaКМК	0,748	0,788	0,001	0,247	0,42	Удовлетв.
16	*Маннит*	*Раствор ПВП*	*КП* XL-10*	*0,640*	*0,955*	*0,001*	*0,010*	*0,15*	*Очень плохо*
17	Лактоза	Раствор ПВП	КП* XL	0,765	0,804	0,240	0,373	0,57	Удовлетв.
18	МКЦ	Вода	NaКМК	0,448	0,957	0,379	0,012	0,44	Удовлетв.
19	Декстраты	Вода	КП* XL-10	0,807	0,941	0,001	0,264	0,47	Удовлетв.
20	Маннит	Вода	КП* XL	0,746	0,945	0,001	0,064	0,28	Плохо
21	*Лактоза*	*Вода*	*Крахмал*	*0,652*	*0,723*	*0,001*	*0,019*	*0,17*	*Очень плохо*
Примечание – КП* – кросповидон.									

Значения функций желательности имели большой разброс (Таблица 19). Наилучшими значениями обобщенной функции обладают образцы **6**, **9** и **10**. Из-за плохих показателей смачиваемости худшими значениями обобщенной функции желательности обладали образцы **16** и **21**.

С целью выявления влияния каждого из уровней факторов на отклики и обобщенный критерий оптимизации был проведен дисперсный анализ с последующей оценкой достоверности различий по критерию Фишера и Дункана. Так как наименее удовлетворительные результаты были получены по оценкам распадаемости, основное внимание было уделено анализу влияния факторов на данные показатели (Таблица 20).

Таблица 20 – Влияние факторов на величину обобщенного критерия оптимизации

Источник изменчивости	**Сумма квадратов SS**	**Степени свободы df**	**Средний квадрат**	**Критерий Фишера $F_{расч.}$**	**Табличное значение $F_{таб., \alpha = 0,05}$**	**Статистическая значимость**
Связующий раствор	0,1821	3	0,0607	**2,77**	4,76	Незначим $p > 0,05$
Наполнитель	0,1300	3	0,0433	**1,98**	4,76	Незначим $p > 0,05$
Дезинтегрант	0,0578	3	0,0193	**0,88**	4,76	Незначим $p > 0,05$
Ошибка	0,1312	6	0,0219	–	–	–
Итого	0,5011	15	–	–	–	–

Как видно из таблицы 20, расчетные значения критерия Фишера для всех трех факторов меньше табличного значения $F_{расч.} < 4,76$, на жестком уровне значимости $\alpha = 0,05$ влияние факторов формально признается статистически незначимым на фоне случайной ошибки эксперимента. Тем не менее связующий раствор обладает наибольшей силой тренда (его F-кратность ближе всего к критической), а дезинтегрант оказывает наименьшее влияние на общую дисперсию данных. Поэтому достоверного влияния факторов на обобщенной критерий оптимизации нет.

Далее проводили дисперсный анализ по среднему арифметическому показателю распадаемости (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты дисперсионного анализа влияния факторов на средний арифметический показатель распадаемости $\left[(d_{3i} + d_{4i})/_2\right]$

Источник изменчивости	**Сумма квадратов SS**	**Степени свободы df**	**Средний квадрат**	**Критерий Фишера, $F_{расч.}$**	**Табличное значение $F_{таб., \alpha = 0,05}$**	**Статистическая значимость**
Связующее вещество	3	0,4745	0,1582	**7,83**	4,76	**Значим** $p < 0,05$
Наполнитель	3	0,4170	0,1390	**6,88**	4,76	**Значим** $p < 0,05$
Дезинтегрант	3	0,1995	0,0665	3,29	4,76	Незначим $p > 0,05$
Ошибка	6	0,1211	0,0202	–	–	–
Итого	15	1,2121	–	–	–	–

Связующее вещество оказывает сильнейшее математически доказанное влияние. Фактор объясняет 39,1 % всей изменчивости обобщенного критерия. Наполнитель также является статистически значимым фактором. Его вклад в общую дисперсию составляет 34,4 %. Дезинтегрант – влияние фактора признается статистически недоказанным.

Таким образом, на показатели распадаемости оказывает влияние вид связующего раствора и наполнитель. Дезинтегрант не оказывает значимого влияние на этот показатель. Такой результат может быть вызван природой действующих веществ: винпоцетин и компоненты экстракта гинкго практически не растворимы в воде.

Основная задача всех тестов на дезинтеграцию – косвенное определение биодоступности, основанное на предположении о прямой зависимости между высвобождением веществ и их всасываемости в ЖКТ. В Государственной Фармакопее в качестве обязательного теста приводится тест ОФС.1.4.2.0013 «Распадаемость твердых лекарственных форм». Основным отличием данного

теста является определение времени дезинтеграции в воде с температурой тела человека. Однако он имеет ряд недостатков. Наиболее серьезным из них является несоблюдение для некоторых композиций прямой зависимости между процессом дезинтеграции таблетки и процессом высвобождения действующего вещества. В ряде публикаций авторы приходят к выводу о целесообразности замены для таблетированных форм теста распадаемости на тест растворения без их совмещения в одной фармакопейной статье [139]. Однако в работах, посвященных Качеству путем проектирования (Quality by Design), отмечается одновременное использование обоих показателей [140].

При рассмотрении влияния связующего и наполнителя на показатели распадаемости была выявлена следующая степень значимости отличий между уровнями факторов (Таблица 22).

Таблица 22 – Ранговый анализ значимости отличий уровней факторов наполнитель и связующий раствор

Связующий раствор				
Место уровня фактора	**1**	**2**	**3**	**4**
Уровень фактора	Клейстер	Гипромеллоза	ПВП	Вода
Значение	0,47	0,47	0,17	0,09
Ранг	–	3,46	3,58	3,64
Наполнитель				
Место уровня фактора	**1**	**2**	**3**	**4**
Уровень фактора	МКЦ	Лактоза	Декстраты	Маннит
Значение	0,52	0,38	0,18	0,11
Ранг	–	3,46	3,58	3,64

По результатам расчета по критерию Дункана найдено значимое отличие между 2-м и 3-м уровнями фактора Связующий раствор. Остальные различия были незначимы.

Несмотря на отсутствие значимости некоторых отличий между уровнями факторов, в данном эксперименте важны самые малые отличия между факторами. Поэтому по результатам всех тестов были составлены ряды желательности вспомогательных веществ в порядке снижения желательности (Таблица 23).

Т а б л и ц а 2 3 – Ряды желательности вспомогательных веществ

Вспомогательное вещество	**Ряд желательности**
Наполнитель	МКЦ > лактоза > декстраты > маннит
Связующее	Крахмальный клейстер 5 % = = раствор ГПМЦ 1 % > раствор ПВП 1 % > вода
Дезинтегрант	Кросповидоны (Полипласдон XL > полипласдон XL-10) > > NaKMK > крахмал картофельный

В отличие от натрия крахмалгликолята и кроскармеллозы натрия, которые дезинтегрируют за счет собственного колоссального разбухания с образованием вязкого геля, кросповидон при контакте с водой не образует геля, сохраняет пористую структуру [141]. В литературе также описан характерный для кросповидонов механизм дезинтегрирующего действия – капиллярное притяжение и деформация [142].

Таким образом, наиболее подходящим наполнителем для таблетированной формы является МКЦ, связующим раствором – крахмальный клейстер или раствор ГПМЦ, дезинтегрантом – полипласдон XL.

При производстве таблеток методом влажной грануляции ГПМЦ превосходит крахмальный клейстер, что подтверждается результатами, где фактором связующего вещества [**39,1 %** изменчивости обобщенного критерия (D) при высокой статистической значимости ($F_{расч.}$ = 7,83 > 4,76)]. В отличие от нестабильного крахмального геля, склонного к ретроградации и вызывающего критические провалы частных критериев распадаемости и растворения, строго стандартизированная ГПМЦ эффективна в низких концентрациях (2–5 %). Формируя быстро гидратирующуюся гидрофильную матрицу, она исключает получение бракованных образцов, минимизирует дисперсию ошибки эксперимента (MS = 0,0202) и гарантирует воспроизводимое получение таблеток с высоким значением отклика функции желательности.

4.4. Доработка состава вспомогательных веществ: наполнителя и связующего вещества

4.4.1. Оптимизация состава за счет вариации наполнителя

По результатам предыдущего эксперимента удалось выявить желательные вещества из трех категорий. Однако очень плохая распадаемость составов требует дальнейшей оптимизации состава.

Возможной причиной существенного увеличения прочности (цементирования) как следствие увеличение времени в тесте «Распадаемость» более регламентируемого норматива может быть ослизнение экстракта гинкго за счет низкой растворимости в водных средах, что согласуется с [134]. Также причиной несоответствия по тесту «Распадаемость» может быть ослизнение и гелеобразование на поверхностном слое таблетки, что описано в [143]. Повысить скорость смачивания и дезинтеграции таблетки можно за счет введения дополнительного дезинтегранта, оптимизация гидрофильности наполнителя за счет введения водорастворимых компонентов или гидрофильных полимеров. Так, прежелатинизированный крахмал, низкозамещенная гипромеллоза (далее ГПЦ) и супердезинтегранты упоминаются как способы создания быстрорастворимых таблеток [144]. При этом для низкозамещённого ГПЦ описывается сочетание мощного набухания и капиллярного эффекта [144]. При этом его многофункциональность отмечается как сочетание сухого связующего и супердезинтегранта [145, 146]. Сочетание введения, набухающего веществ в состав гранул вместе с введением супердезинтегранта в опудривание гранул, упоминается как способ создания быстродиспергируемых таблеток [147]. Другой подход заключается в добавлении агентов, повышающих смачиваемость, таких как твин-80 (полисорбат-80) из-за повышения смачиваемости поверхности таблетки [148, 149].

Исходя из данных литературы были предложены три меры:

– введение гигроскопичного полимера (прежелатинизированного крахмала Starch 1500) в соотношении 1:4 от МКЦ;

– введение в гранулят солюбилизатора твин-80 (полисорбат-80);

– введение в состав гранулята низкозамещенной ГПЦ (JRS L-HPC LH-21, далее – ГПЦ) в количестве 50 % от количества МКЦ.

С целью проверки влияния данных изменений получали таблеточные массы, и таблетки, содержащие экстракта гинкго 64 мг и винпоцетина 10 мг, способом влажного гранулирования. Составы, изготовленные для исследования, приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Составы таблеток, использованные для проверки влияния вспомогательных веществ на высвобождение винпоцетина

Образцы	**22**		**23**		**24**		**25**	
Ингредиенты:	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**
Экстракт гинкго, г	10,000	21,70	10,000	20,80	10,000	20,70	10,000	21,80
Винпоцетин, г	1,613	3,50	1,613	3,40	1,613	3,30	1,613	3,50
МКЦ РН-101, г	**33,000**	**71,60**	**29,784**	**62,00**	**35,042**	**72,50**	**16,500**	**36,00**
ГПЦ, г	**–**		**–**		**–**		**16,500**	**36,00**
Starch 1500, г	**–**		**5,256**	**10,90**	**–**		**–**	
Твин-80, г	**–**		**–**		**0,242**	**0,50**	**–**	
Раствор ГПМЦ 0,05 % (Pharmcoat 603), мл	2,300	4,76	2,300	4,76	2,300	4,76	2,300	4,76
В т. ч. сухой ГПМЦ	0,115	0,24	0,115	0,24	0,115	0,24	0,115	0,24
Стеарат магния, г	0,483	1,00	0,480	1,00	0,483	1,00	0,414	1,00
Кросповидон (Polyplasdone XL), г	0,966	2,00	0,960	2,00	0,966	2,00	0,828	2,00

В процессе производства контролировали сыпучесть гранулята после опудривания, отсутствие налипания на пуансоны и сколов на таблетке, а также распадаемость таблеток согласно методикам ГФ XV (Таблица 25).

Результаты определения свойств таблеток показали пригодность всех масс с точки зрения качества формирования таблеток: не было ни налипания на пресс-

инструмент, ни сколов, а сыпучесть таблеточных масс составила от 10,7 до 11,6 г/с. Однако тест «Распадаемость» показал большие значения времени дезинтеграции для образцов исходного состава и состава с добавлением прежелатинизированного крахмала (более 40 минут). Введение твина-80 позволило сократить время дезинтеграции до (26,7 ± 9,6) минут, а замена 50 % наполнителя на ГПЦ – до (9,25 ± 0,25) минут, что видимо доказывает необходимость дополнительно разрушать гранулы за счет капиллярного эффекта.

Таблица 25 – Фармацевтико-технологические свойства таблеточных масс и таблеток, предназначенных для выявления влияния гидрофильных полимеров

	Образцы	**22**	**23**	**24**	**25**
гранулят	Сыпучесть гранулята, г/с	11,6 ± 0,5	10,7 ± 1,1	11,4 ± 2,1	11,2 ± 1,7
	Насыпная плотность гранулята, г/см^3	0,41 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,27 ± 0,02
таблетки	Распадаемость таблеток, мин	Более 40	Более 40	26,7 ± 9,6	9,25 ± 0,25
	Прочность таблеток, Н	92,2 ± 12,3	87,1 ± 10,9	75,2 ± 11,1	52,3 ± 12,2
	Высота таблеток, мм	4,32 ± 0,03	4,64 ± 0,08	4,86 ± 0,07	5,53 ± 0,05
	Прочность на истирание, %	99,54	99,23	99,11	98,01
	Описание	Таблетки коричневого цвета с мраморной поверхностью плоскоцилиндрической формы с фаской и риской			

Сам по себе тест «Распадаемость» характеризует не столько возможность высвобождения вещества, а скорость дезинтеграции таблетированной формы. Более информативен, с точки зрения высвобождения конкретного химического вещества, тест «Растворение» [150]. Однако разработка и валидация методики для еще не разработанного до конца состава не рациональна, так как на этапах разработки вполне достаточно будет менее точных методик. Поэтому на этапах разработки была использована спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях для оценки высвобождения действующих веществ.

4.4.2. Выбор методики оценки степени высвобождения винпоцетина

В соответствии с ОФС.1.4.2.0014 «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм» для многокомпонентных препаратов допускается определение растворения по наименее растворимому веществу. Винпоцетин на несколько порядков менее растворим чем ТТЛ и флавоноиды: ~0,005–0,025 мг/мл воды для винпоцетина, ~0,01–0,15 мг/мл воды (в форме агликонов) для флавоноидов гинкго и ~0,1–0,3 мг/мл воды для ТТЛ. При этом винпоцетин также наиболее липофилен: logP 4,0–4,3, 1,5–3 и 0,5–1,5 соответственно для винпоцетина, флавоноидов и ТТЛ [151, 152]. Поэтому контроль высвобождения действующего вещества проводили только по содержанию винпоцетина.

Так как винпоцетин обладает высокой растворимостью в 0,1М соляной кислоте, то этот раствор и был выбран в качестве основного растворителя. Далее согласно предложенной методике (см. материалы и методы), отбирали пробы в разные интервалы времени: от самого начала до 10 минут каждую минуту, а далее с шагом в 5 минут в течение еще 30 минут.

Спектроскопия в УФ области была выбрана в качестве экспресс-метода для оценки высвобождения винпоцетина на этапе разработки лекарственной формы (Рисунок 21).

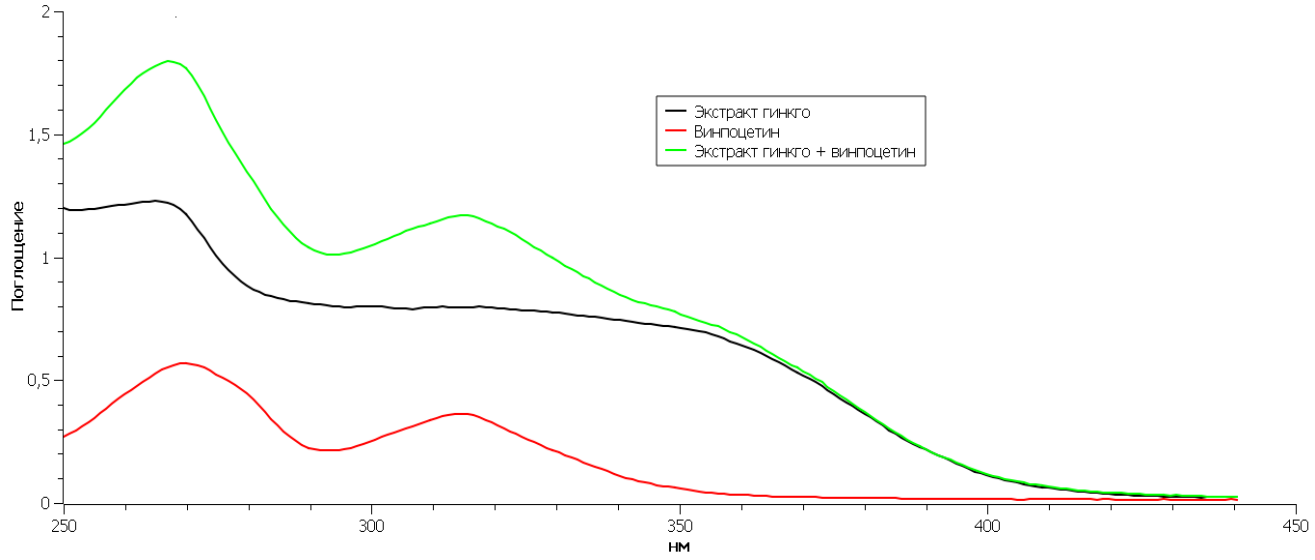


Рисунок 21 – Спектры поглощения винпоцетина, экстракта гинкго и суммы в 0,1М соляной кислоте

Из УФ-спектра видно, что поглощение экстракта гинкго наблюдается на всем диапазоне УФ спектра и суммируется с поглощением винпоцетина. То есть для оценки концентрации винпоцетина необходимо было вычесть из интенсивности вклад экстракта. Для этой цели на модельных смесях находили соотношение поглощения экстракта при 268 и 314 нм по отношению к поглощению при 360 нм, так как при этой длине волны не поглощает винпоцетин. Затем находили вклад в суммарное поглощение экстракта гинкго и оценивали оптическую плотность, соответствующую концентрации винпоцетина как разницу между оптическими плотностями.

Для контроля высвобождения было выбрано количественное определение по оптической плотности из-за простоты проведения. Подобный метод детектирования не специфичен для винпоцетина и может давать систематическую ошибку из-за наложения сигнала флавоноидов экстракта гинкго. Но так как проводилось сравнение процесса высвобождения образцов с различными составами вспомогательных веществ и одинаковым количеством действующих, то данной ошибкой можно было пренебречь. В результате полученные кривые характеризуют процесс дезинтеграции таблетки и данные по высвобождению винпоцетина – наименее растворимого в воде компонента.

Дополнительно для оценки пригодности методики определяли линейность отклика (Рисунок 22). В результате получено высокое значение коэффициентов аппроксимации для ключевых длин волн: 0,998 и 0,999 для 270 и 314 нм соответственно.

Сравнение кривых высвобождения винпоцетина из полученных таблетированных форм может дать информацию о причинах уменьшения времени распадения. Кривые при длине волны детектирования 314 нм приведены на рисунке 23.

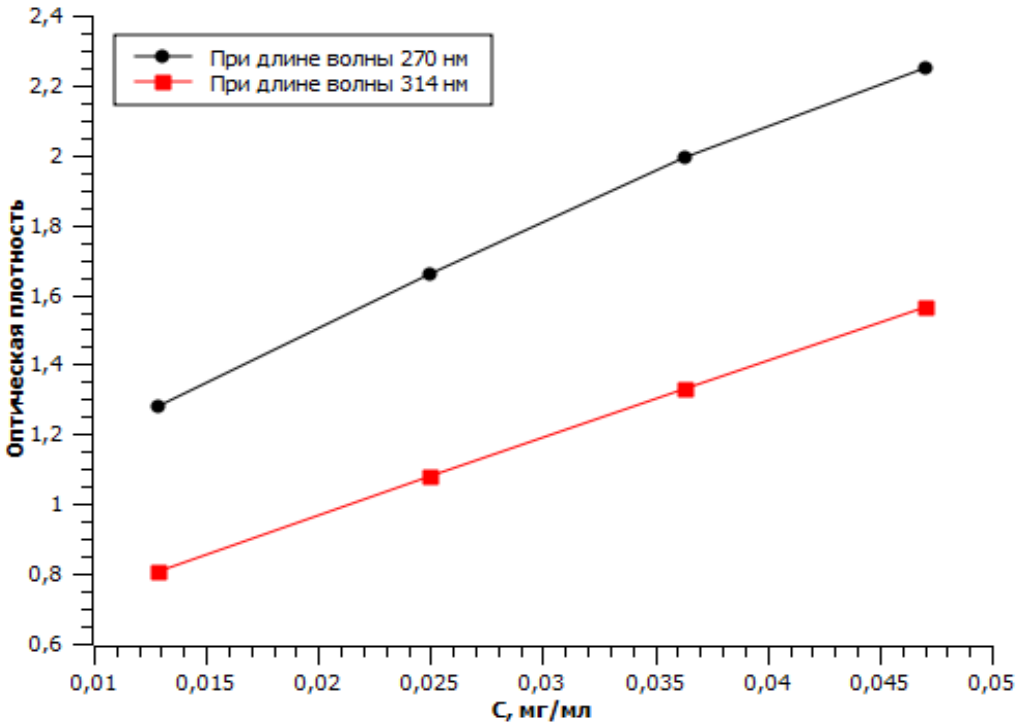


Рисунок 22 – Зависимость оптической плотности от концентрации винпоцетина в модельной смеси при длинах волн 270 и 314 нм. Коэффициент корреляции при 270 и 314 нм составил 0,998 и 0,999 соответственно

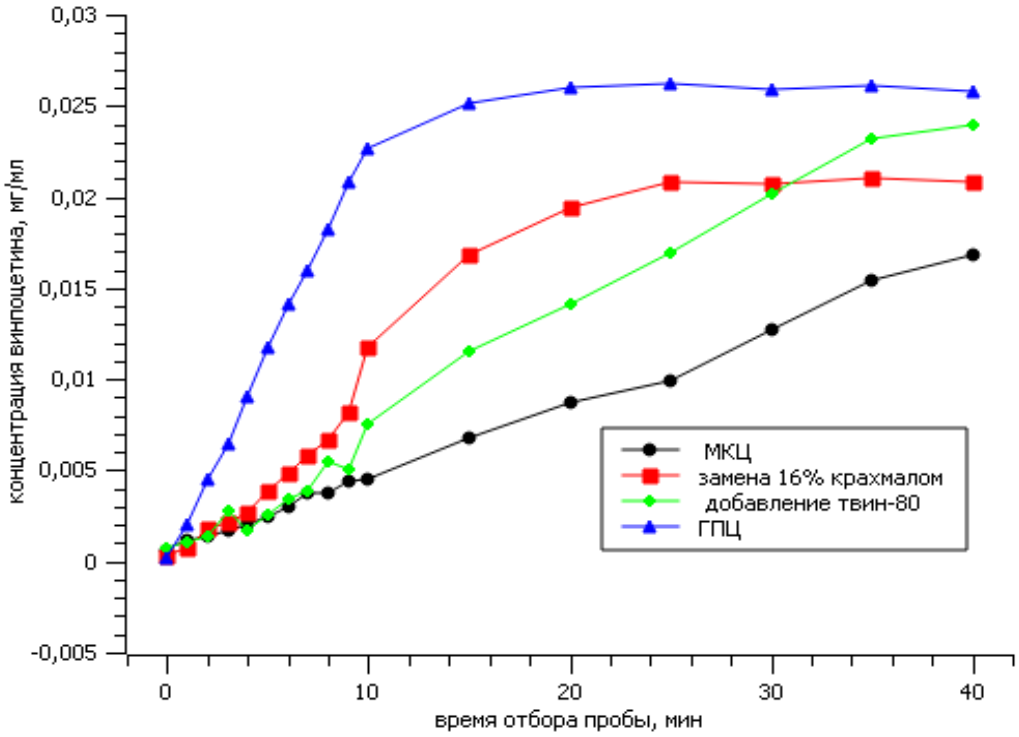


Рисунок 23 – Внешний вид кривых высвобождения винпоцетина. Приведены по одной параллели для каждого из образцов **22–25**

В ходе проведения экспресс-теста на высвобождение винпоцетина объем растворителя, изъятый для очередного анализа, не восполнялся. Вследствие этого возникала систематическая ошибка определения винпоцетина, заключающаяся в завышении его содержания. Данную ошибку учитывали при расчете концентрации винпоцетина. Также для удобства интерпретации кривые растворения каждой серии преобразовали в виде временных диаграмм размаха, отражающие помимо среднего значения также наименьшее, наибольшее значения и доверительный интервал для каждой временной точки графика. В результате можно оценить достоверность изменения количества винпоцетина в разных временных точках (Рисунок 24).

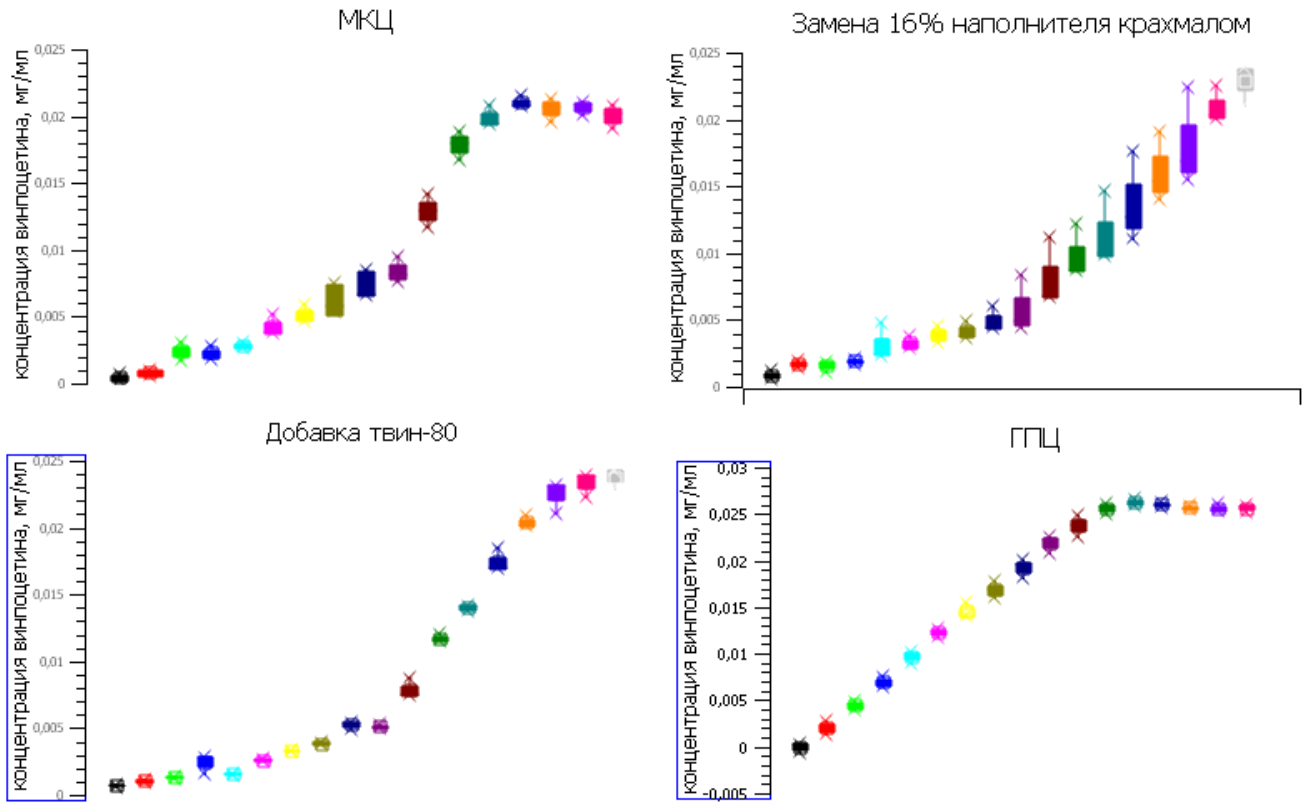


Рисунок 24 – Диаграммы размаха высвобождения винпоцетина из таблеток образцов **22–25**. Данные представлены прямоугольником соответствуют квартилям 25 и 75 %, отрезок – разбросом от минимального до максимального значений

Непригодность микрокристаллической целлюлозы без добавок, а также с заменой 16 % от нее на прежелатинизированный кукурузный крахмал

(образец **23**), видна из большого разброса количества винпоцетина внутри одного определения и достаточно долгим периодом достижения максимума концентрации (40 и 25 минут соответственно, рисунок 23). Причиной данного факта может быть затруднение проникания жидкости во внутреннюю часть таблетки из-за желирования верхних слоев, что согласуется с [134]. В то же время составы с наполнителем ГПЦ : МКЦ 1:1 (образец **25**) и МКЦ модернизированный добавлением твин-80 (образец **24**) в гранулят приводят к пошаговому, достоверному нарастанию концентрации. Но нарастание имеет различный характер в двух этих составах: для состава **24** нарастание начинается с 7 минуты, а для состава **25** – начиная уже с 1 минуты. Причиной, видимо, является потенцирование дезинтегрантов двух видов (супердезинтегранта и набухающего ГПЦ), использованных методом внутри-внегранулярного введения [153, 154].

Поэтому, прежде чем предполагать причины отличий в кривых высвобождения винпоцетина, необходимо описать разницу между составами путем рассмотрения аппроксимации относительно линейной и полиномной (2-й степени) математической модели. Для этого проводили апроксимационный анализ как каждой из кривых высвобождения целиком, так и отдельных их частей (Рисунок 25 и Таблица 26).

В случае образца **22** (наполнитель только МКЦ) процессы смачивания и распадения растянуты во времени и затруднены. В результате кривая вырождается в прямую. Образцы **23** и **24** имеют более выраженные стадии дезинтеграции и смачивания. Образец **25** практически не имеет плато смачивания, переходя сразу к деагрегации таблетки.

Введение прежелатинизированного крахмала (Starch® 1500) должно было способствовать проникновению воды в массу таблетки за счет увеличения пористости. Однако время дезинтеграции таблеток не изменилось. В результате анализа кривой высвобождения можно говорить об ускорении растворения винпоцетина за счет увеличения скорости дезинтеграции, без существенного изменения процесса смачивания таблетки по всему объему.

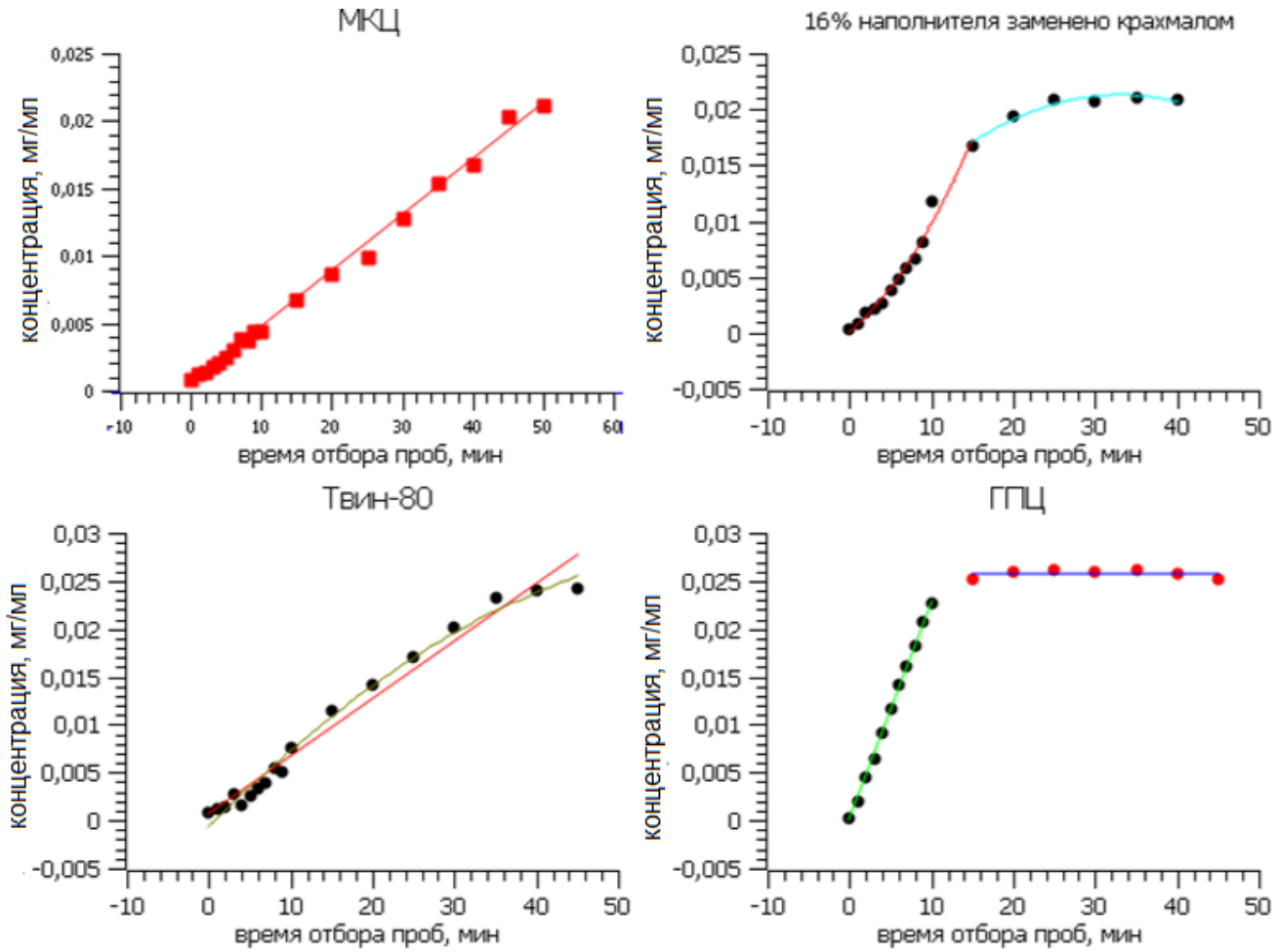


Рисунок 25 – Аппроксимация кривых высвобождения винпоцетина составов 22–25. Фактические результаты представлены точками. Кривые аппроксимации – линиями. Если для одной кривой рассматривалось несколько линий аппроксимации, то они выделены разным цветом

Таблица 26 – Приближение кривых высвобождения к функциям – линейной и полиномом второй степени

Образец	**Диапазон отбора проб**	**Вид распределения**	**Коэффициент аппроксимации**
22 – МКЦ	Весь	Линейное	0,9965
23 – 16 % заменено на крахмал	С 0 до 9	Полиномная второй степени	0,9827
	С 10 по 40		0,9684
24 – твин-80	С 0 до 15	Полиномная второй степени	0,9703
25 – ГПЦ	С 0 до 10	Линейная	0,9990

Похожие изменения процесса растворения наблюдаются и при введении твин-80. За счет солюбилизирующего и эмульгирующего действия компонента происходит ускорение дезинтеграции и растворения действующих веществ.

При анализе кривых становится очевидна причина уменьшения периода распадаемости состава с заменой 50 % МКЦ на ГПЦ. Только данная комбинация обеспечивала резкое линейное нарастание концентрации винпоцетина в начале теста. Остальные композиции в тех же условиях обеспечивали плавное нарастание, переходящее в резкий рост только после 10 минут растворения. Причиной данного явления, с нашей точки зрения, является повышение смачиваемости таблетки для образца ГПЦ : МКЦ. При этом профиль больше похож на профиль высвобождения вещества из быстродиспергируемых таблеток, однако низкая прочность на разлом таблетки и неудовлетворительная насыпная плотность таблеточной массы не дают признать данный состав оптимальным.

4.4.3. Оптимизация соотношения наполнителя и связующего вещества

В ходе следующего эксперимента проверяли соотношение МКЦ и ГПЦ в качестве смешанного наполнителя. Грануляты получали описанным в Главе 2 методом. Подозревая, что высокое количество ГПМЦ в связующем растворе связано с плохим высвобождением винпоцетина, снизили концентрацию связующего вещества до 0,05 %. Составы, используемые для последующего исследования, приведены в таблице 27.

Полученные грануляты образцов **26–28** обладали низкой сыпучестью, поэтому таблетирование по ним не проводилось. Причиной может быть недостаточное количество связующего и/или низкая доля ГПЦ. Для повышения сыпучести были предложены следующие меры:

1) увеличить концентрацию раствора связующего вещества (раствор гидроксипропилметилцеллюлозы до 0,5 % и 1 %);

2) изменить количество микрокристаллической целлюлозы относительно гидроксипропилцеллюлозы в различных соотношениях (0:2, 1:2, 2:2).

Смешивали действующие вещества и наполнитель в соответствии с расчетными составами (Таблица 28). У полученных гранулятов измеряли насыпную плотность до и после уплотнения и сыпучесть (Таблица 29).

Таблица 27 – Составы гранулятов, использованные для выбора соотношения ГПЦ : МКЦ

Образец	**26**		**27**		**28**	
Ингредиенты:	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**
Экстракт гинкго, г	5	27,78	5	24,09	5	21,27
Винпоцетин, г	0,807	4,48	0,807	3,89	0,807	3,43
МКЦ РН101, г	**2,75**	15,28	**5,5**	26,50	**8,25**	35,10
ГПЦ, г	**8,25**	45,83	**8,25**	39,75	**8,25**	35,10
Раствор ГПМЦ 0,05 % (Pharmcoat 603), мл	1,2	6,67	1,2	5,78	1,2	5,10
Примечание – Расчет сделан на гранулят без учета состава планируемой таблетки.						

Таблица 28 – Составы гранулятов, использованные для проверки влияния вспомогательных веществ на насыпную плотность и сыпучесть

Образец		**29**		**30**		**31**		**32**		**33**		**34**	
Ингредиенты:		**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**
Экстракт гинкго		5	30,57	5	30,57	5	23,60	5	23,60	5	19,01	5	19,01
Винпоцетин		0,807	4,93	0,807	4,93	0,807	3,81	0,807	3,81	0,807	3,07	0,807	3,07
МКЦ РН-101		–	–	–	–	**4,125**	**19,47**	**4,125**	**19,47**	**8,25**	**31,36**	**8,25**	**31,36**
ГПЦ		**8,25**	**50,44**	**8,25**	**50,44**	**8,25**	**38,95**	**8,25**	**38,95**	**8,25**	**31,36**	**8,25**	**31,36**
Раствор ГПМЦ (Pharmcoat 603), мл	**0,5 %**	**2,3**	**14,06**	–		**3**	**14,16**	–		**4**	**15,21**	–	
	1 %	–		**2,3**	**14,06**	–		**3**	**14,16**	–		**4**	**15,21**

Таблица 29 – Свойства гранулятов с разным соотношением ГПЦ и МКЦ, а также разного количества связующих

Составы	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**
Насыпная плотность гранулята до уплотнения, г/см^3	0,201 ± 0,003	0,206 ± 0,003	0,231 ± 0,003	0,242 ± 0,003	0,252 ± 0,007	0,265 ± 0,007
Насыпная плотность гранулята после уплотнения, г/см^3	0,352 ± 0,002	0,386 ± 0,002	0,297 ± 0,003	0,306 ± 0,003	0,307 ± 0,004	0,303 ± 0,006
Сыпучесть, г/с	6,2 ± 1,2	6,8 ± 1,2	7,3 ± 2,0	7,8 ± 1,6	8,0 ± 1,4	8,1 ± 1,3

Наибольшая сыпучесть соответствовала соотношениям наполнителей МКЦ : ГПЦ 1:1, а насыпная плотность – для ПЦ без МКЦ. Замена 0,5%-го на 1%-й раствор ГПМЦ значимо повышал насыпную плотность для составов на ГПЦ и смеси МКЦ : ГПЦ 1:3. Видимо, оптимум соотношения ГПЦ и МКЦ меньше, чем 1:1.

В дальнейшем для улучшения насыпной плотности было предложено следующее:

1) изменить количество ГПЦ относительно МКЦ в различных соотношениях (1:3; 2:3);

2) сократить количество наполнителя так, чтобы доля экстракта гинкго составила до 35 %. Это позволит сделать гранулят плотнее. С этой целью масса одной таблетки должна быть сокращена до 180–190 мг.

Полученные составы делили на две равных части и в качестве связующего раствора использовали раствор гидроксипропилцеллюлозы 0,5 % и 1 % соответственно. Составы, используемые для исследования, приведены в таблице 30.

Таблица 30 – Составы таблетированной формы комбинации винпоцетина и экстракта гинкго с различным соотношением ГПЦ : МКЦ

Образец		**35**		**36**		**37**		**38**	
Ингредиенты:		**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**	**m, г**	**%**
Экстракт гинкго		5,000	36,35	5,000	33,44	5,000	31,25	5,000	33,68
Винпоцетин		0,807	5,87	0,807	5,40	0,807	5,04	0,807	5,44
МКЦ PH-101		4,125	29,99	4,125	27,59	4,125	25,78	4,125	27,79
ГПЦ		1,375	10,00	1,375	9,20	2,750	17,19	2,750	18,52
Раствор ГПМЦ (Pharmcoat 603)	0,50 %	2,100	15,27	–		2,900	18,13	–	
	1 %	–		3,300	22,07	–		1,800	12,12
Опудривание:									
Стеарат магния		0,116	0,84	0,114	0,76	0,139	0,87	0,121	0,82
Кросповидон (Polyplasdone XL)		0,233	1,69	0,229	1,53	0,279	1,74	0,243	1,64

Результаты определения сыпучести показали пригодность таблеточных масс составов **35–38** с точки зрения качества формирования таблеток (Таблица 31). В процессе производства контролировали сыпучесть гранулята после опудривания, отсутствие налипания на пуансон и сколов на таблетке, а также время распадаемости таблеток согласно общепринятым методикам. Значения основных фармако-технологических свойств представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Фармако-технологические свойства гранулятов и таблеток

	Составы	**35**	**36**	**37**	**38**
гранулят	Сыпучесть, г/с	5,28 ± 0,08	5,07 ± 0,05	4,75 ± 0,16	4,67 ± 0,12
	Насыпная плотность до уплотнения, г/см^3	0,313 ± 0,004	0,353 ± 0,002	0,334 ± 0,004	0,368 ± 0,002
	Насыпная плотность после уплотнения, г/см^3	0,476 ± 0,005	0,496 ± 0,004	0,498 ± 0,005	0,503 ± 0,004
Таблетки	Распадаемость, мин	30 ± 3	30 ± 4	20 ± 1,3	25 ± 2,3
	Прочность таблеток, Н	62,3 ± 13,2	65,4 ± 9,8	75,8 ± 11,3	77,5 ± 12,4
	Истираемость, %	98,31	98,73	99,02	98,89
	Описание	Таблетки коричневого цвета с мраморной поверхностью плоскоцилиндрической формы с фаской и риской			

Уменьшение доли ГПЦ в отношении к МПЦ приводит к повышению насыпной плотности. В новых составах доля МКЦ и экстракта гинкго в сумме составляет **от 57 до 66 %**. МКЦ PH-101 имеет собственную насыпную плотность порядка 0,26–0,32 г/см³, а сухой экстракт гинкго после распылительной сушки – около 0,45–0,55 г/см³ [155, 156]. Их доминирование повышает насыпную плотность, однако увеличение доли экстракта гинкго привело к критическому снижению сыпучести (ниже 6 г/с), что не дает считать данные составы оптимальными.

Для кривых высвобождения винпоцетина строили временные диаграммы размаха для высвобождения винпоцетина (Рисунок 26). Доля ГПМЦ (Pharmcoat® 603) не влияет на скорость высвобождения, но повышает воспроизводимость результатов растворения внутри одного образца. На высвобождение оказывает

влияние соотношение ГПЦ и МКЦ, но увеличение доли ГПМЦ не приводит к увеличению скорости высвобождения. В результате анализа кривой можно говорить о плавном нарастании. Снижение концентрации ГПЦ до 9–10 % (образцы **35** и **36**) создает временной барьер в 7 минут на дезинтеграцию. Повышение ГПЦ до 17–18 % (образцы **37** и **38**) полностью устраняет этот барьер, запуская процесс смачивания гидрофобного винпоцетина мгновенно.

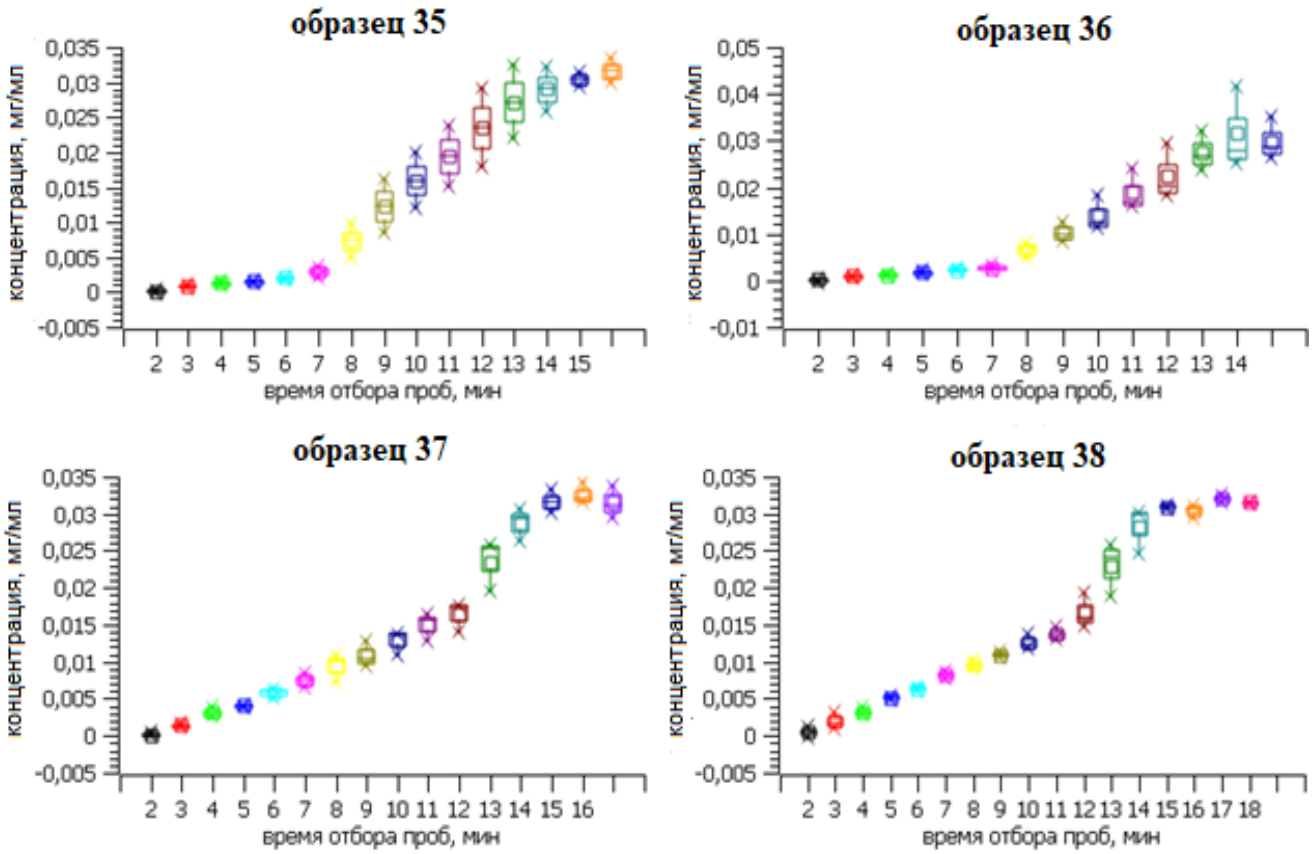


Рисунок 26 – Влияние соотношения ГПЦ : МКЦ и связующего вещества на кривые высвобождения винпоцетина из таблеток образцов **35–38**

Таким образом, можно предположить, что сочетание таких факторов как соотношение ГПЦ и МКЦ 2:3 при наличии в составе супердезинтегранта обеспечивает оптимальный процесс дезинтеграции таблетки. Увеличение ГПМЦ немного повышает сыпучесть таблеточной массы и прочность таблетки. Но снижение доли наполнителя до 40 % приводит к снижению сыпучести и времени в тесте «Распадаемость».

Исходя из особенностей предыдущих образцов, был выбран состав таблетированной формы:

1) соотношение наполнителей ГПЦ и МКЦ 2:3;

2) доля наполнителя до 66 % таблеточной массы и средняя масса таблетки до 280 мг;

3) количество связующего раствора повышено относительно первых образцов гранулирования (Таблица 32).

Т а б л и ц а 3 2 – Итоговый состав таблетированной формы

Состав 39	**Эксперимент**		**Содержание на**	
	m, г	%	1 табл., мг	1000 таблеток, г
Экстракт гинкго	5,00	20,90	64	64,00
Винпоцетин	0,81	3,37	10	10,00
МКЦ PH-101	9,06	37,87	116	116,00
ГПЦ	6,04	25,24	77	77,00
Раствор ГПМЦ (Pharmcoat® 603) 1 %	2,30	9,61	–	–
В т. ч. ГПМЦ	0,03	0,10	2	2,00
Опудривание:				
Стеарат магния	0,24	1,00	3	3,00
Кросповидон (Polyplasdone® XL)	0,48	2,01	6	6,00
Масса таблетки, мг			278	

Полученный состав характеризовался допустимыми оптимальными значениями показателей (Таблица 33).

По результатам исследования был выбран способ получения таблетированной формы в виде влажной грануляции раствором ГПМЦ в сочетании с комплексным наполнителем. Итоговый состав включает, помимо действующих веществ, два наполнителя (МКЦ и ГПЦ), связующие в виде 1%-го раствора, а также смесь для опудривания на основе стеарата магния и полипласдона XL-10. Состав, обозначенный как 39, приведен в таблице 32.

Таблица 33 – Фармацевтико-технологические показатели качества гранулята и полученных из него таблеток

Показатель	Значение
Сыпучесть, г/с	7,9 ± 0,8
Насыпная плотность до уплотнения, г/см^3	0,39 ± 0,03
Насыпная плотность после уплотнения, г/см^3	0,46 ± 0,03
Высота таблетки, мм	4,2 ± 0,1
Распадаемость, мин	13,73 ± 1,34
Прочность таблеток на раздавливание, Н	101,4 ± 20,3
Прочность на истирание, %	99,85
Описание	Таблетки коричневого цвета с мраморной поверхностью плоскоцилиндрической формы с фаской и риской

По результатам работ по выбору состава компонентов и технологии была составлена технологическая схема получения таблетированной формы (Приложение Е). На основании состава и выбранной технологии производства таблеток составили лабораторный регламент (Приложение 7). Данные технологических исследований внедрены в учебный процесс (акт внедрения, Приложение И).

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

Была показана неприменимость методики прямого прессования для таблетированной формы экстракт гинкго + винпоцетин 64+10 мг. Были проведены 4 этапа оптимизации состава вспомогательных веществ. Разработана методика экспресс определения высвобождения веществ (винпоцетина как самого плохо растворимого действующего вещества).

Разработан состав таблетированной формы (Таблица 33): экстракт гинкго – 64 мг, винпоцетин – 10 мг, МКЦ РН-101 – 116 мг, ГПЦ – 77 мг, раствор ГПМЦ (Pharmcoat® 603) – 1 %, стеарат магния – 3 мг и кросповидон (Полипласдон XL) – 6 мг.

ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

5.1. Выбор и оптимизация методик для стандартизации готового лекарственного препарата

Для разработки проекта нормативного документа критически значима информация о потенциальных рисках для каждой лекарственной формы. Эта информация позволяет оценить наиболее важные показатели качества готовой продукции [139, 140]. Разработка лекарственного препарата включает создание методик контроля качества готовой продукции, разработку спецификации.

При анализе Государственной фармакопее и примеров стандартизации готовых таблетированных форм можно выделить следующие показатели, включаемые в спецификацию: «Описание», «Подлинность», «Количественное определение», «Однородность массы» (или «Однородность дозирования»), «Распадаемость», «Растворение», «Истираемость», «Прочность на раздавление», «Родственные примеси», «Микробиологическая чистота».

К связанным испытаниям можно отнести пары показателей: «Растворение» – «Распадаемость» и «Однородность дозирования» – «Однородность массы». В литературных данных можно встретить случаи включения всех возможных показателей [157]. Часть показателей проводятся по полностью фармакопейным методикам, в то время как «Количественное определение», «Подлинность». «Однородность дозирования и «Родственные примеси» требуют создания и валидации специализированных методик. Для замены «Однородности массы» на «Однородность дозирования» требуется проведение последнего испытания для всех действующих веществ, исключая поливитамины, минеральные комплексы, а также препараты растительного или животного происхождения, для которых в обязательном порядке сохраняется контроль однородности массы.

Часть показателей ГФ XV издания вынесены в технологический процесс. Так, «Прочность на раздавливание» и «Истираемость» не включаются в спецификацию на готовый таблетированный препарат. Фармакопея ЕАЭС добавляет указание на применимость в ряде случаев показателя «Остаточные органические растворители».

5.2. Проблемы стандартизации таблетированных форм с точки зрения оценки рисков возникновения и обнаружения несоответствий в процессе гражданского оборота

Отдельную значимость для процессов фармацевтической разработки несут несоответствия качества серий, уже находящихся в гражданском обороте. Выявление недоброкачественных серий может стать следствием не обнаруженного нарушения условий производства. Поэтому особое внимание в процессе фармацевтической разработки стоит уделить внимание именно таким показателям.

В связи с унификацией системы прозрачности контроля качества лекарственных средств начиная с конца 2018 года информация по обращению систематизируется и отображается в нескольких базах Росздравнадзора. Так, начиная с 2019 по данным Росздравнадзора можно отследить как профиль по показателям несоответствий препаратов по годам, так и динамику на данном временном отрезке [158]. В литературе, тем временем, рассматривают изъятые лекарственные средства, указывая недоброкачественность как наиболее распространённую причину отзыва и упоминая по каким показателям выявлены несоответствия. При этом данные показатели рассматриваются суммарно для всех лекарственных форм, что не позволяет оценить риски для отдельных, например, интересующих нас таблетированных форм [159, 160]. В то же время для учета рисков при производстве отдельных форм критически важным является оценка вероятности выявления несоответствия [161, 162].

В связи с этим нам представляется актуальным рассмотреть показатели, несоответствие по которым наиболее часто выявляется в процессе обращения для таблетированных лекарственных форм.

В качестве единицы учета использовали сообщение, то есть один факт обнаружения, вне зависимости от количества серий в одном сообщении. В отличие от подсчета по сериям, данный подход более информативен для производителя, так как позволяет исключить влияние кратности производства и сосредоточится на выявлении «спонтанных» несоответствий. Из информационных писем сформировали базу данных, содержащую указанную выше информацию только для таблеток. Из базы данных были исключены таблетки для рассасывания, так как среди них трудно отделить лекарственные препараты, получаемые по технологии леденцов.

Сбор данных проводили на 2 периодах: вручную по письмам в период 2013–2016 гг. и по данным сервиса Росздравнадзора 2019–2024 гг. При сравнении данных реестра в период 2019–2024 гг. видно, что таблетированные препараты составляют большую долю (73,5 %) от всех случаев приостановления обращения, но всего 4,3 % от отзыва и 6,8 % от прекращения обращения. В то же время на капсулы приходится 2,4 % отзыва и 2 % прекращения от всех лекарственных препаратов (Таблица 34). При сравнении состава типов сообщений внутри этих двух групп (капсул и таблеток) также заметно, что капсулы больше подвержены отзыву или прекращению обращения, нежели таблетки. Видимо причиной можно считать высокую проработанность таблетированной лекарственной формы с точки зрения менеджмента качества. Выявление наличия или отсутствия данной динамики в период до 2018 г. было невозможно из-за первоначального ограничения сбора данных.

При анализе решений по письмам, собранным в период 2013–2016 гг., и сопоставления с данными периода 2019–2024 гг. Намечается существенная разница между периодами, что говорит о положительном влиянии автоматизации и систематизации данных. При этом внутри обоих периодов наблюдается тенденция на снижение писем об отзыве ЛП и увеличение результатов

по прекращению обращения. Сводная диаграмма, включающая показатели обоих периодов, показывает тенденцию на снижение отзывов и симметричное нарастание прекращения обращения (Рисунок 27).

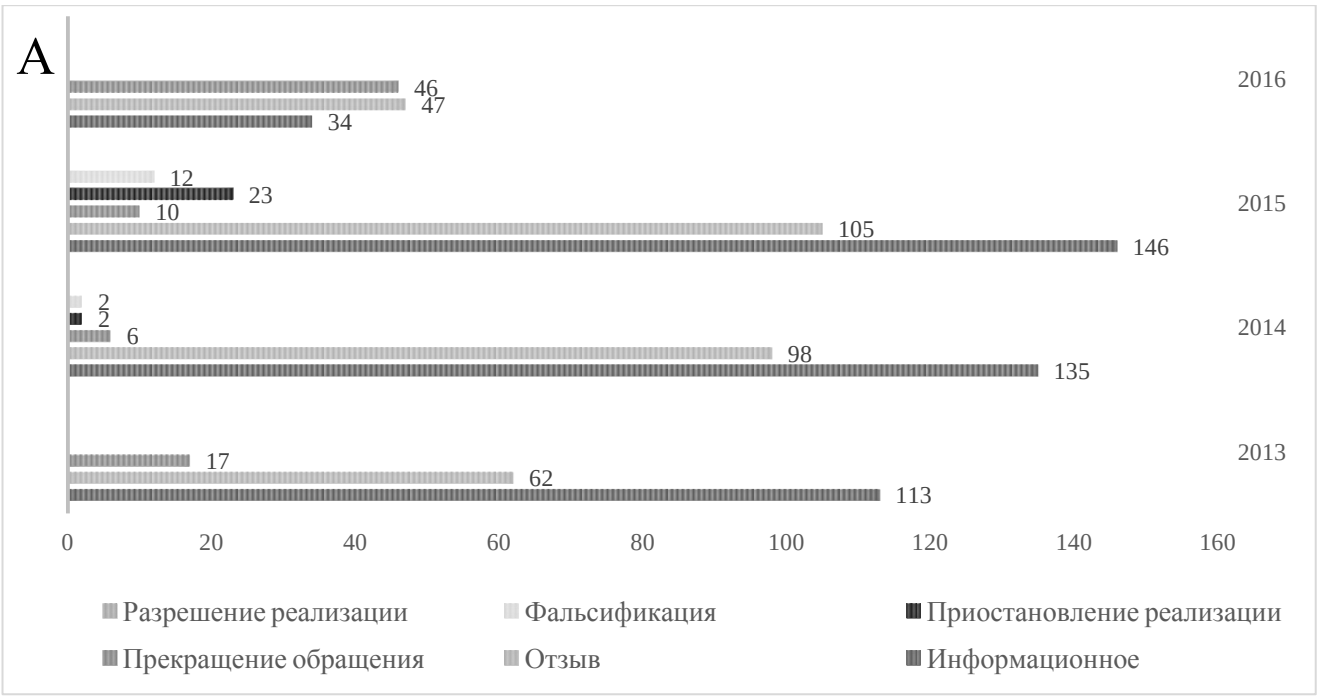
Таблица 34 – Виды решений, принятые регулятором на основании анализа сообщений сервиса «Поиск изъятых из обращения лекарственных средств» Росздравнадзора в случаях выявления отклонений в качестве лекарственных препаратов за период 2019–2024 гг.

Решение	**Все ЛП**		***Таблетки***		**Капсулы**	
	шт	**%**	**шт**	**%**	**шт**	**%**
Изъятие	139	1,25	*0*	*0,00*	0	0,00
Информационное	392	3,54	*157*	*12,07*	19	7,92
Отзыв	8422	76,03	*363*	*27,90*	198	82,50
Прекращение обращения	1169	10,55	*79*	*6,07*	23	9,58
Приостановление реализации	955	8,62	*702*	*53,96*	0	0,00
Итого	11077		*1301*		240	

При этом разрешения на реализацию и случаи фальсификации были спорадическими, что не позволяет их проанализировать отдельно.

При рассмотрении абсолютного количества писем с отзывом и с прекращением обращения можно увидеть колебания около нулевого тренда (от 80 до 120 в год) в течение обоих периодов.

Динамика показывает незначительное увеличение числа отзывов и прекращений обращения. При этом динамика по подобным сообщениям по одному показателю колеблется не значительно и без тренда на увеличения.



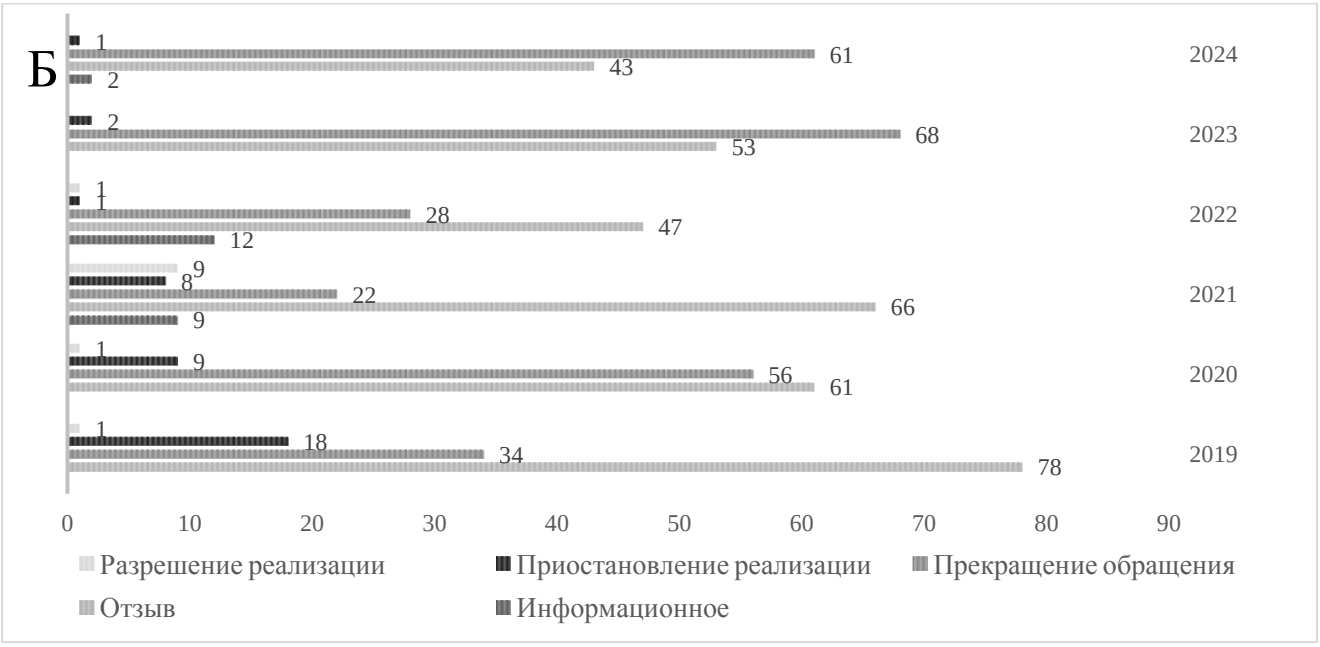


Рисунок 27 – Виды решений (разрешение реализации, фальсификация, приостановление реализации, отзыв) принятых после выявления несоответствий в отношении лекарственных препаратов в лекарственной форме таблетки за периоды 2013–2016 гг. (26А) и 2019–2024 гг. (26Б)

При сравнении случаев одновременного несоответствия наибольший вклад вносят случаи с одним показателем, несоответствия по двум показателям стоят на втором месте, хотя за 2024 год и было выявлено аномально большое

количество ЛП, несоответствие которых выявлено по 3 показателям, а в 2023 – по двум (Рисунок 28).

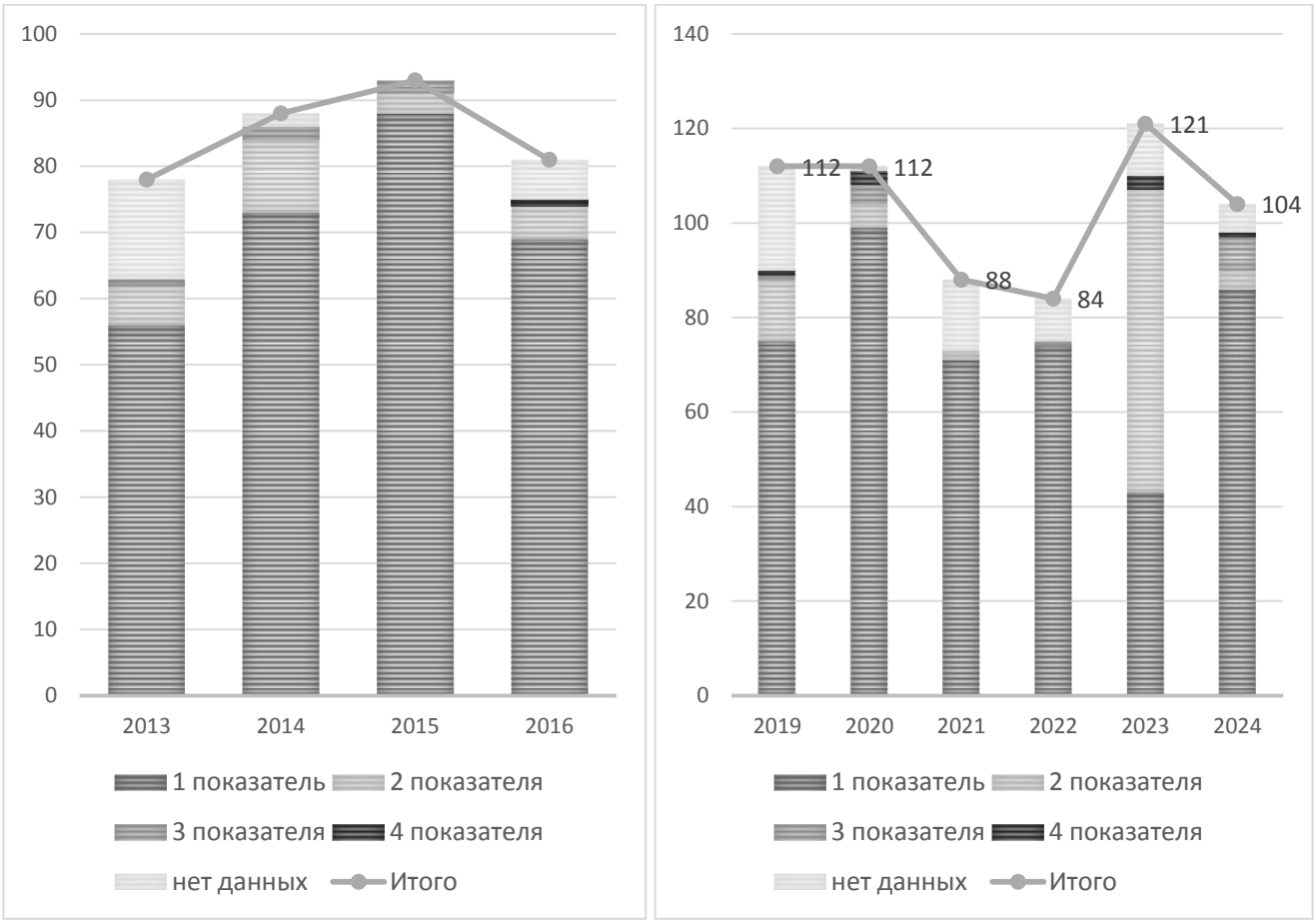


Рисунок 28 – Количество показателей, приведших к формированию сообщения для отзывов и прекращения обращений на обоих периодах [2013–2016 гг. (слева) и 2019–2024 гг. (справа)]. Цифрой обозначена сумма по всем показателям

5.2.1. Ранжирование показателей, по которым были отозваны или изъяты лекарственные препараты

Результаты по каждому году ранжировали по правилу Парето и выделяли показатели, несоответствие по которым давали больший вклад в сумму несоответствий за каждый год. Показатели отсекались на уровне 80 %. Пример рассмотрения данных за год приведен в Приложении К. Все показатели, несоответствие по которым вошло в 80 % нарастающего итога, собраны в таблице 35.

Таблица 35 – Показатели, являющиеся причиной более 80 % всех несоответствий по годам (в каждый из годов рассматриваемого периода)

	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2019 г.
Увеличение вклада в нарастающем итоге	*Микробиологическая чистота*	*Микробиологическая чистота*	Растворение	**Посторонние примеси**	**Посторонние примеси**
	Описание	Описание	Количественное определение	Количественное определение	Растворение
	Растворение	Количественное определение	Маркировка	Отзыв декларации о соответствии	Описание
	Подлинность	Отзыв производителем	Посторонние примеси		Количественное определение
	Средняя масса таблеток	**Посторонние примеси**	Описание	Растворение	Маркировка
	Маркировка		Отзыв производителем	Описание	
	Распадаемость	Растворение		Упаковка	Однородность массы таблеток
	Остаточные органические растворители	Распадаемость		Маркировка	
	2020 г.	**2021 г.**	**2022 г.**	**2023 г.**	**2024 г.**
Увеличение вклада в нарастающем итоге	Растворение	Растворение	Растворение	**Родственные примеси**	Растворение
	Подлинность	Описание	Описание		**Родственные примеси**
	Количественное определение	Маркировка	Распадаемость		
	Посторонние примеси	Распадаемость	**Родственные примеси**	Растворение	
	Маркировка	**Родственные примеси**	Упаковка	Количественное определение	Количественное определение
	Описание				
	Микробиологическая чистота	**Посторонние примеси**			Маркировка
	Распадаемость				

Вне зависимости от года, наибольший вклад вносили несоответствия по показателю «Растворение». При этом можно выделить четыре наиболее часто встречающихся показателя: «Растворение», «Количественное определение», «Маркировка» и «Описание». Также отмечается значимость показателей «Микробиологическая чистота» и «Подлинность». Такие показатели как «Примеси», «Родственные примеси» и «Посторонние примеси» вносят достаточно большой вклад в 2014, 2016, 2019 – 2024 гг. Наиболее высокое положение при ранжировании данные показатели занимали в 2016, 2019 и 2023 годах. При этом необходимо учесть, что в 2016 году показатель «Посторонние примеси» заменен на показатель «Родственные примеси», что связано приведением стандартов качества в соответствие с международными требованиями. До 2016 года органические примеси, возникающие в процессе разрушения и/или синтеза действующего вещества, относили к показателю «Посторонние примеси». Вместе с тем в период 2018–2021 гг. формировались требования по обязательном включении показателя «Родственные примеси» [163]. Связано это может быть таже с затруднением разработки данного показателя из-за разного подхода к побочным органическим соединениям в готовой форме и в активной фармацевтической субстанции [164].

5.2.2. Взаимосвязь показателей при несоответствии по двум и более одновременно

Для случаев несоответствия более чем одному показателю отдельно рассматривали возможные связи между ними. Основной целью было выявить повторяющиеся случаи совместного несоответствия. Для упрощения визуализации и с учетом малых значений использовали сумму за каждый период раздельно (2013–2016 и 2019–2024 гг.).

Перед началом визуализации из рассмотрения были убраны «Подлинность», «Адсорбционная активность» из-за редкости упоминания. Для показателей «Родственные примеси», «Посторонние примеси» и «Примеси» данные были убраны из-за изменения требований регулятора.

Для визуализации полученных данных использовали специально построенный график, основанный на пузырьковой диаграмме (Рисунки 29 и 30). В данных графиках высота расположения шарика соответствует общему количеству случаев несоответствия по конкретному показателю, в том числе и как несоответствия по 1 показателю. Диаметр шарика демонстрирует случаи, когда данный показатель был упомянут при несоответствии хотя бы с одним другим. Линиями изображены случаи несоответствий по двум конкретным показателям, включая случаи 2 и более показателей. Подчеркнутыми числами обозначено количество случаев сочетания показателей.

Из рисунка 29 видно, что в период с 2013 по 2016 г. наибольшее количество несоответствий было по показателю «Растворение» (53 случая), приближается к нему показатель «Описание» (41 случай). Остальные показатели встречались от 20 до 38 раз. При этом чаще всего в случаях отклонений более чем в двух показателях встречался показатель «Распадаемость» (14 случаев). Следующим по распространенности были показатели «Растворение» (7 случаев), «Средняя масса» (6 случаев), «Упаковка» (8 случаев) и «Описание» (5 случаев). Линиями отражены случаи совместного несоответствия двух конкретных показателей. Наибольшее количество различных сочетаний были связаны с показателем «Распадаемость» (12 сочетаний с 5 другими показателями). Следующим был показатель «Упаковка» (8 сочетаний с двумя показателями). Также хотя бы с двумя другими показателями были связаны «Описание», «Микробиологическая чистота» и «Средняя масса».

Для периода 2019–2024 гг. результаты были немного другие (Рисунок 30). Кратно больше случаев несоответствия были связаны с показателем «Растворение» (163 случая), «Количественное определение (57 случаев), «Описание» (50 случаев) и «Маркировка» (47 случаев). Наиболее часто сочетались с отклонениями минимум в 2 показателях – «Количественное определение» (22 случая с тремя показателями) и «Растворение» (16 случаев с тремя показателями). При этом, в отличие от предыдущего периода, повысилось число сочетания показателей «Растворение» и «Количественное определение» (11 случаев).

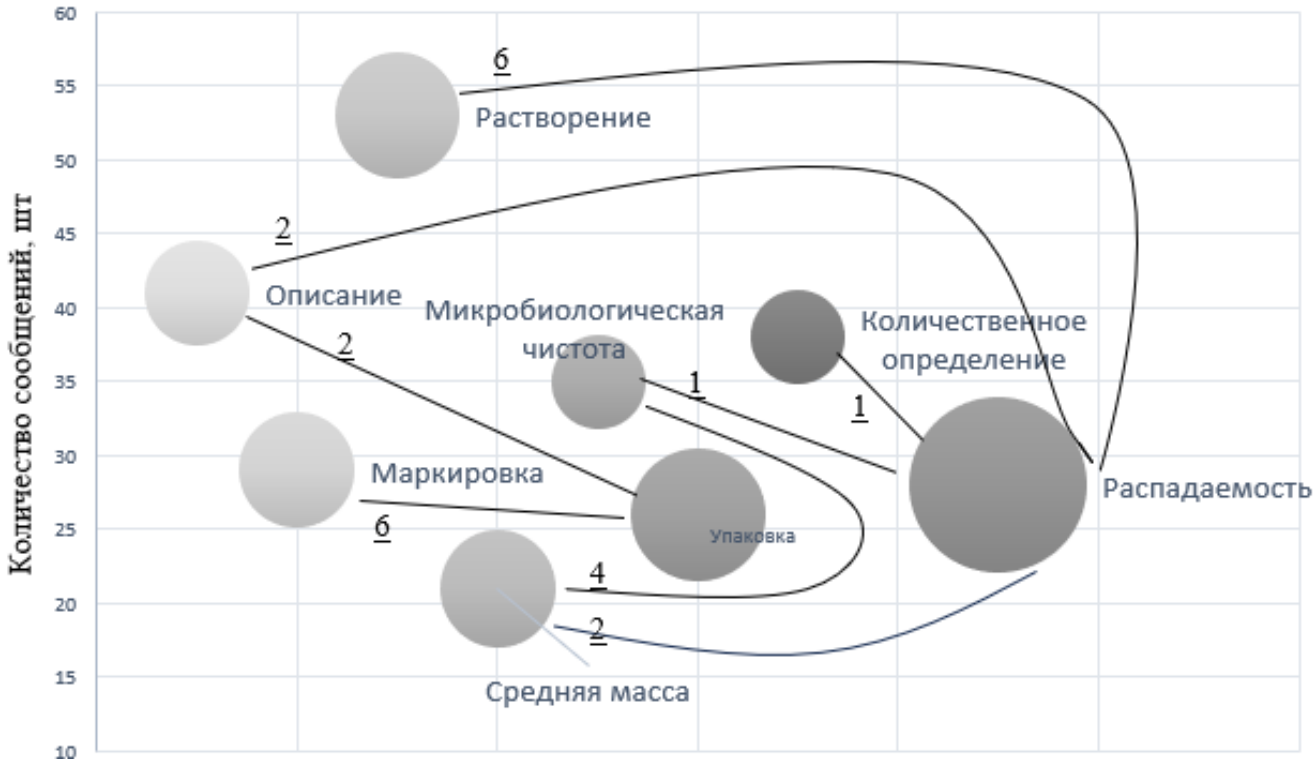


Рисунок 29 – Взаимосвязь показателей для периода 2013–2016 гг.

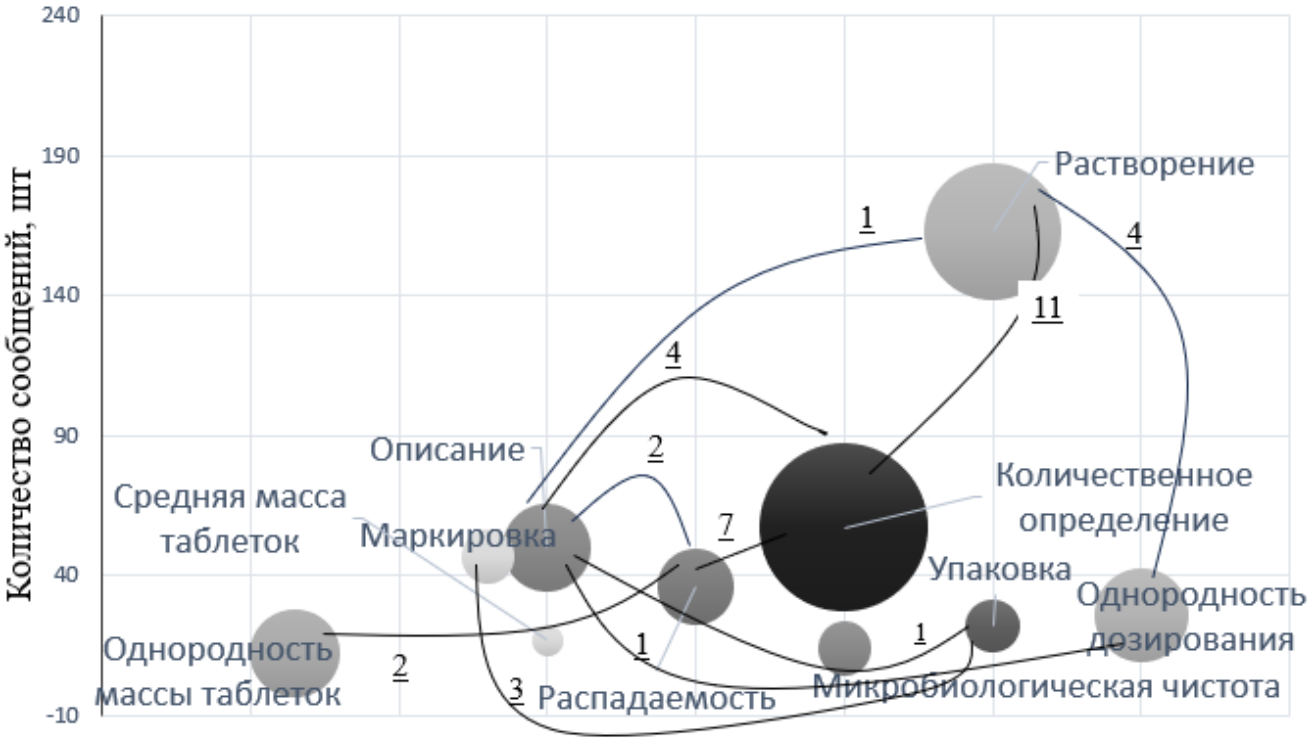


Рисунок 30 – Взаимосвязь показателей для периода 2019–2024 гг.

В результате анализа совместных случаев несоответствия с наибольшим количеством отклонений по другим показателям наблюдаются отклонения по «Описанию» и «Упаковки» в обоих рассматриваемых периодах. При этом отслеживаются совместное несоответствие показателей «Описание», «Упаковка» и «Маркировка», что может свидетельствовать о сохранении трудности их разграничения. Однако самый весомый вклад вносит взаимосвязь «Количественного определения» и «Растворения», что отмечено в период 2019–2024 гг. Наблюдаемая нами тенденция может быть связана с общемировой тенденцией повышения внимания к растворению как компоненту оценки биоэквивалентности *in vitro* при сравнении воспроизведенного лекарственного препарата с оригинальным. Труднорастворимые вещества также могут быть связаны с несоответствиями по показателям «Растворение» и «Количественное определение».

5.2.3. Общие тенденции несоответствий

Анализ данных выявил пики несоответствий качества таблеток в 2015, 2020 и 2023 годах, при этом период с 2019 года отличается лучшей систематизацией информации, несмотря на сохраняющиеся сложности в идентификации причин отзывов, и резкий рост доли комплексных нарушений (по двум и более показателям) к 2023 году.

Анализ данных по принципу Парето показал, что ключевым фактором несоответствий во все периоды является показатель «Растворение», входящий в группу основных критических параметров наряду с «Количественным определением», «Маркировкой» и «Описанием». Рост значимости показателей «Примеси», «Родственные примеси» и «Посторонние примеси» (особенно в 2014–2024 гг.) обусловлен переходом на международные стандарты и внедрением обязательных требований к контролю родственных примесей.

Смещение акцента в сторону более объективных методов контроля привело к снижению значимости органолептических и формальных показателей, таких как «Описание» и «Маркировка», на фоне изменений в нормативном регулировании

отзывов препаратов. Для повышения качества мониторинга провели детальный анализ причин изъятия серий из обращения, классифицировав их по стадиям технологического процесса и разработав меры по управлению рисками, несмотря на сохраняющийся дефицит конкретных данных в части информационных писем.

Анализ показал, что в обоих периодах сохраняются трудности в разграничении показателей «Описание», «Упаковка» и «Маркировка», часто приводящие к их совместным отклонениям. Обнаружено отсутствие случаев отзыва продукции из-за иностранной маркировки, при этом выявлена тенденция к росту комплексных несоответствий, обусловленная сложностью разграничения показателей «Упаковка», «Маркировка» и «Описание». Использование уточненного правила Парето (70/30) позволило установить, что основными причинами нарушений являются несоответствие вторичной упаковки макету (24 %), дефекты поверхности таблеток (12 %) и ошибки в нанесении данных о серии (7 %).

С 2019 года наметилась четкая взаимосвязь между «Количественным определением» и «Растворением», что обусловлено ростом доли труднорастворимых веществ и усилением внимания к тестам биоэквивалентности *in vitro*. С 2021 года старый обобщенный термин «Посторонние примеси» был окончательно упразднен в отношении органических веществ и заменен на строго дифференцированные показатели, среди которых ведущим стал показатель «Родственные примеси».

В ходе разработки лекарственного препарата на этапах лабораторного регламента важнее сфокусироваться на показателях, требующих разработки методик. Ряд из них («Количественное определение», «Растворение» и «Родственные примеси») по результату анализа случаев несоответствия заслуживают особого внимания.

5.3. Стандартизация композиции на основе экстракта гинкго и винпоцетина

После анализа причин несоответствия таблетированных форм лекарственных препаратов были выбраны следующие показатели, несоответствие по которым может наблюдаться даже на этапе обращения: «Количественное определение», «Растворение», «Распадаемость». Показатель «Родственные примеси» также может быть критичен для разработки. Среди указанных показателей «Количественное определение», «Однородность дозирования» и «Растворение» часто используют одну и ту же методику ВЭЖХ с подходящим детектором. «Родственные примеси» иногда могут быть оценены той же методикой. Однако в ряде случаев используют отдельно разработанную методику, большинство из которых ВЭЖХ-УФ.

5.3.1. Выбор методики идентификации и количественного определения винпоцетина и компонентов экстракта листьев гинкго

Для разработки количественного определения необходимо рассмотреть анализ экстракта листьев гинкго по содержанию флавоноидов и терпеновых трилактонов (двум группам целевых аналитов экстракта), а также винпоцетина. Методики и подтверждения подлинности, и количественного определения многокомпонентных смесей всегда связаны с разделением компонентов, поэтому часто «Подлинность» сочетают с другими показателями. Основными методами остаются хроматографические (тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография), реже высокочувствительные методы – флуоресценция и масс-спектрометрия. Для разработки методов количественного определения винпоцетина могут быть приемлемы методики на основе флуоресценции. В литературе нет спектров флуоресценции для винпоцетина. Помимо традиционно ассоциируемых с флуоресценцией веществ (рибофлавин, тетрациклин [165]), описана применимость флуоресценции для экспресс-анализа лекарственных препаратов (на примере папаверина и дротаверина) [166].

5.3.2. Флуоресценция как метод анализа винпоцетина

Порошок винпоцетина флуоресцирует светло-голубым при облучении УФ-светом 365 нм, хотя максимумы поглощения винпоцетина в растворителях колеблется в диапазоне 310–317 нм [167]. В литературе описан метод идентификации винпоцетина в таблетках [168], однако для смеси винпоцетина с экстрактом листьев гинкго недеструктивный метод неприменим. Однако, если извлечь винпоцетин растворителем, есть возможность подобрать условия флуоресцентного определения винпоцетина и/или использования флуоресцентного детектора ВЭЖХ. Поэтому исследовали флуоресценцию винпоцетина в различных по полярности растворителях: вода очищенная, подготовленный для УФ-спектроскопии хлороформ, бензол, толуол, этиловый спирт, этилацетат предварительно подготовленный изопропиловый спирт, ацетон, этиленгликоль. Только два растворителя сохраняли флуоресценцию винпоцетина – бензол и хлороформ. При растворении в бензоле флуоресценция выражена ярче, чем при растворении в хлороформе (Таблица 36). Для понимания специфичности флуоресценции винпоцетина проверяли его флуоресценцию по сравнению со стандартами папаверина гидрохлорида и дротаверина гидрохлорида. Испытание проводили для растворов 0,5 мг/мл в соответствующих растворителях (Таблица 36).

Таблица 36 – Визуальное наблюдение флуоресценции винпоцетина, папаверина и дротаверина в различных растворителях

Растворитель	**Винпоцетин**	**Папаверина г/х**	**Дротаверина г/х**
Толуол	Свечение ярко голубого цвета	Свечение слабо голубого цвета	–
Бензол	Свечение ярко голубого цвета	Свечение слабо голубого цвета	–
Хлороформ	Свечение светло зеленого цвета	Свечение светло синего цвета	Свечение светло синего цвета
Вода	–	–	–
Соляная кислота разведенная	–	–	–

Продолжение таблицы 36

Растворитель	**Винпоцетин**	**Папаверина г/х**	**Дротаверина г/х**
Этилацетат	Свечение зеленого цвета	Свечение слабо голубого цвета	–
Ацетонитрил	Свечение очень слабое желтого цвета	–	–
Изопропиловый спирт	Свечение слабо зеленого цвета	Свечение слабо голубого цвета	–
Метанол	Свечение слабо желтого цвета	–	–

Максимум испускания для винпоцетина в хлороформе равен 434 нм, при интенсивности 0,0032, а в толуоле – 443 нм (интенсивности 0,0036). Максимум испускания у папаверина г/х в хлороформе наблюдается при 357 нм, что существенно отличается от спектра винпоцетина. Дротаверина гидрохлорид в среде 0,1 М серной кислоты демонстрирует максимальную интенсивность нативной флуоресценции при длине волны испускания 465 нм (возбуждение 295 нм) [169]. Спектры флуоресценции по регистрации приведены в Приложении Л.

5.3.3. Определение линейности флуоресценции винпоцетина

Использование флуоресценции для количественного анализа возможно при линейности отклика. Для оценки линейности фиксировали спектр по испусканию. Максимумы испускания, используемые для оценки линейности, были при 434 нм для раствора винпоцетина в хлороформе и 443 нм в толуоле (возбуждение проводили при 315 нм). Полученные данные приведены в виде графиков с линейной аппроксимацией (Рисунки 31 и 32).

Линейность наблюдалась в диапазоне 0,025–0,045 мг/мл (коэффициент аппроксимации 0,9883). Линейность в толуоле наблюдалась ограниченно в диапазоне 0,02–0,065 мг/мл с низким коэффициентом аппроксимации 0,5882 (Рисунок 32).

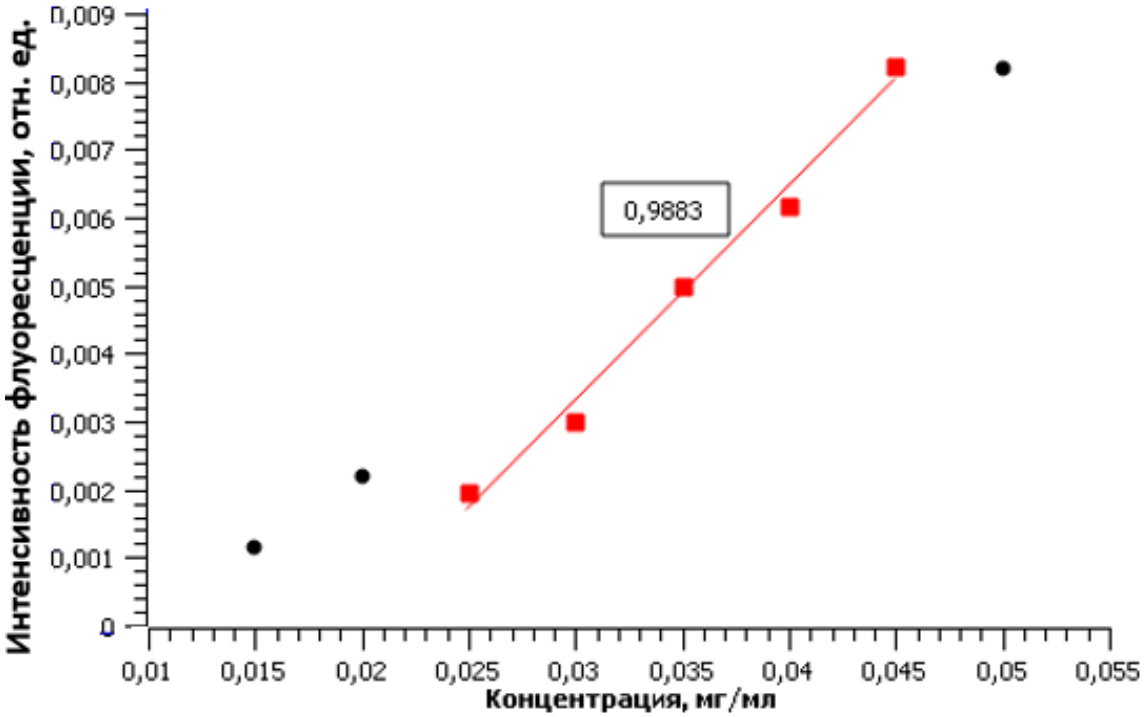


Рисунок 31 – Зависимость интенсивности флюоресценции винпоцетина в хлороформе при возбуждении 314 нм. Интенсивность флуоресценции определяли при 434 нм. Красным отмечены точки, учтенные при определении линейности

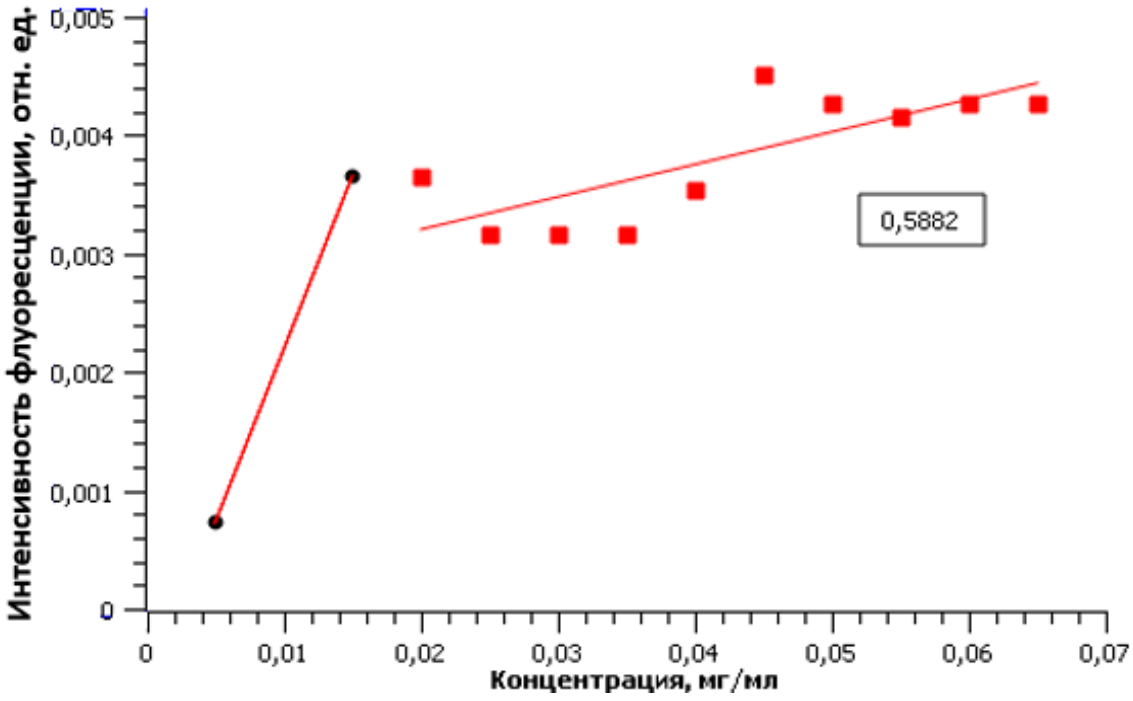


Рисунок 32 – Зависимость флуоресценции при возбуждении 443 нм

Для проверки вклада тушения из-за протонирования приготовили раствор с концентрацией 4 мг/мл аналита. Протонирование проводили раздельно двумя кислотами: серной и соляной концентрированными. Визуально фиксировали исчезновение флуоресценции после добавления концентрированной серной кислотой, следовательно, происходит протонирование молекулы винпоцетина. В опыте с соляной кислотой не заметно изменение интенсивности флуоресценции.

У винпоцетина наблюдается флуоресценция в оптически подготовленном хлороформе и толуоле. Гашение при протонировании затрудняет анализ и требует извлечения неполярными органическими растворителями или упаривания и повторного растворения, что внесет дополнительную погрешность в методы количественного обнаружения.

5.3.4. Разработка методики анализа терпеновых трилактонов с использованием предварительной дериватизации

В случае использования флуориметрического детектора рационально было бы совместить количественное определение двух классов действующих веществ: винпоцетина и одного из классов экстракта гинкго. Флавоноиды хорошо исследованы и показана пригодность методик ВЭЖХ-УФ.

Терпеновые трилактоны не флуоресцируют из-за отсутствия цепей сопряжения в молекуле. Соответственно флуориметрические методы применимы только после дериватизации с использованием флуоресцентной метки. С целью выявления наиболее подходящей формы флуоресцентной метки были рассмотрены химические свойства терпеновых трилактонов.

Из химических реакций наиболее изучен процесс алкилирования гинкголидов [170]. Пространственное строение гинкголидов отличается высоким стерическим затруднением. Этерификацию гинкголида В использовали для получения циннамата: проводили при 0 °С в ацетонитриле, дополнительно использовав 4-диметиламинопиридин и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид. Выход реакции – 58,5 %, реакция идет по положению С10 [171].

В другой публикации рассматривается сравнительная реакционная способность гидроксилов у атомов С1, С10 и С7: ацилирование по гидроксилу в положении С10, в то время как гидроксильные группы в положениях С1 и С7 в реакцию не вовлекаются. Также в данной работе было сделано заключение о легкости окисления гидроксила в положении С7 в гинкголиде С под действием хромовой смеси в ацетоне [170].

Процесс алкилирования может существенно ускорится при микроволновом излучении. Так показана возможность введения четырех заместителей: гидроксиметильного, аминоэтильного, диметиламиноэтильного и метиламиноэтильного. Время продолжительности реакции – 3 минуты при 85 °С. Дополнительным катализатором служит йодид калия и основание (карбонат кальция или калия). Выходы соединений колебались от 76,3 до 94,1 % [172].

Подобную технологию микроволнового излучения также использовали для этерификации по 10 положению гинкголидов С, В и К. В качестве заместителей использовали диметиламиноэтил, аминоэтил, метиламиноэтил, гидроксиэтил. Выходы реакций составляют от 17,5 до 94,1 % [170].

Высокая стабильность гинкголидов к окислению подтверждается литературными данными. Так, для окисления гидроксильной группы в положении 1 описано использование оксида хрома (VI) в разбавленной серной кислоте в среде ацетона [171]. При этом сохраняется не только гидроксил в положении 3 без защиты, но и остаются интактными все лактоны. Причем различные производные давали различные продукты окисления с выходом около 60 %.

Также на разнице окислительно-восстановительных свойств основано выделение терпеновых трилактонов из листьев или экстракта. За счет стабильности последних при кипячении в 5%-й перекиси водорода происходит отделение от легко окисляемых флавоноидов [171].

В качестве реакции дериватизации было предложено нуклеофильное замещение кислорода карбоксильной группы лактонов гинкголидов с образованием амидов или лактамов, при этом образование лактамов и амидов

одинаково возможные исходы реакции (на примере 4-метил-2-фуранонов) [173]. Однако в литературе есть упоминания преобладания или получения только одного из продуктов, например амидов [174].

Получение флуоресцентных реагентов. Для придания флуоресцентных свойств продуктам реакции синтезировали флуоресцентные метки, основанные на пирене (**Pyr**) в качестве флуорофора. Флуоресцентные реактивы изготавливали из пирена, ориентировались на высокие флуоресцентные свойства пирена [175, 176]. Для преодоления стерической затрудненности терпеновых трилактонов были выбраны две возможные функциональные группы для введения в пирен: аминометильная и карбоксильная. При конструировании метки вариант аминопирена был отвергнут из-за потенциального стерического затруднения. Для повышения вероятности протекания реакции использовали удлинение углеродного скелета – получение аминометилпирен (**NPyr**), пирен-1-карбоновая кислота (**PyrCOOH**) [177]. Синтез флуоресцентных меток, использованных в дальнейшем для дериватизации ТТЛ, приведен на рисунке 33.

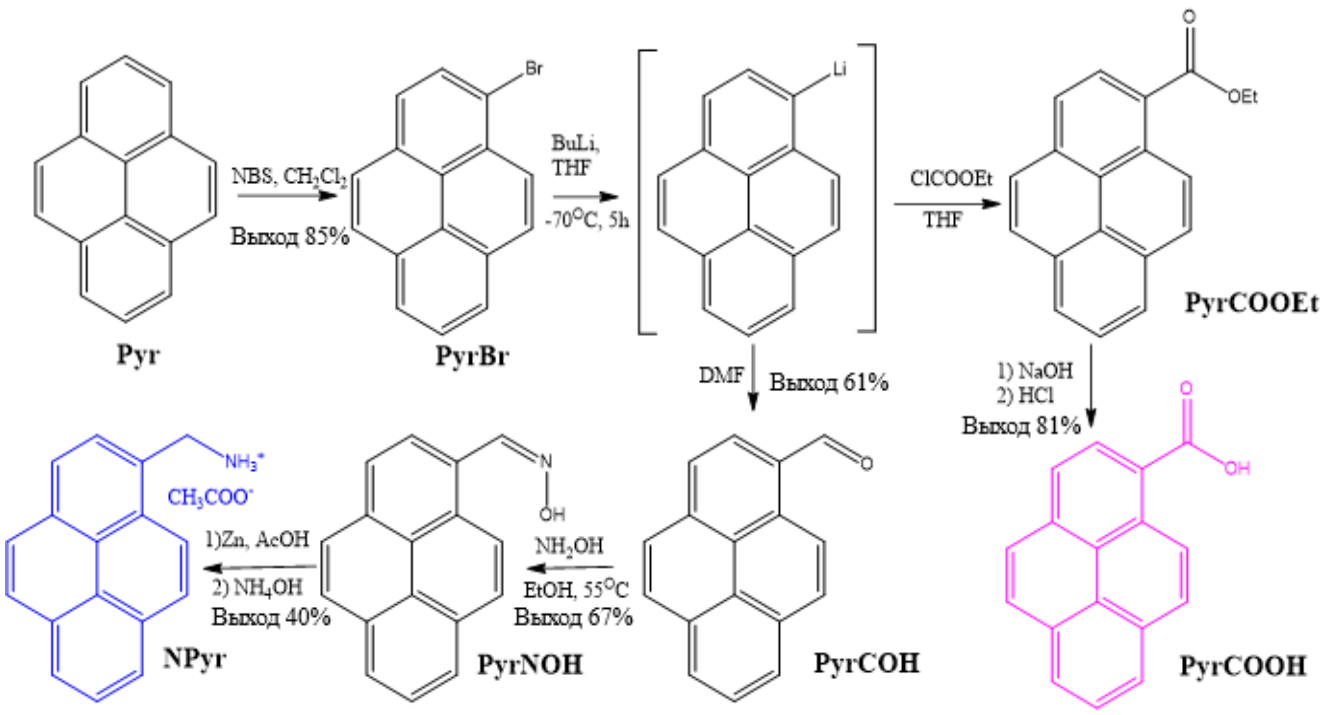


Рисунок 33 – Схема получения двух флуоресцентных меток: пиренкарбоновой кислоты (**PyrCOOH**) и аминометилпирена (**NPyr**)

Наработку бромпирена (**PyrBr**) проводили согласно описанной методике при комнатной температуре [178]. Следующие две стадии проводились в одной колбе. В начале получали пирен-1-иллития в виде желтого осадка. Далее в растворе ТГФ взаимодействие пирен-1-иллития *in situ* за счет ДМФА приводит к пирен-1-карбальдегиду (**PyrCOH**). Строение продукта находится в соответствии с данными ЯМР ^{1}H, ^{13}C, масс-спектрометрии и элементного анализа. Так, спектр ЯМР ^{1}H содержит характеристичный синглет альдегидного протона – 10,81 м. д. Взаимодействие пирен-1-иллития также *in situ* с этилхлорформиатом приводит к этиловому эфиру пирен-1-карбоновой кислоты (**PyrCOOEt**). Данный продукт без выделения подвергали гидролизу в среде водного этанола, в результате чего количественно образовывалась пирен-1-карбоновой кислота (**PyrCOOH**). В данных ЯМР ^{1}H наблюдали характеристичный уширенный синглет протона карбоксильной группы в области 13,03 м. д.

Взаимодействие карбальдегида (**PyrCOH**) с гидроксиламином (растворитель – этанол) в атмосфере аргона при 50–55 °С приводит к пирен-1-карбальдегидоксиму (**PyrNOH**). Выполнение данной реакции на воздухе или повышение температуры приводят к значительному снижению выхода. В соединении (**PyrNOH**) спектр ЯМР ^{1}H содержит характеристичные синглеты метина =CH- (7,78 м. д.) и протона группы N–OH (9,14 м. д.). 1-аминометилпирен (**NPyr**) использовали описанную ранее методику восстановления оксима (**PyrNOH**) цинковой пылью в уксусной кислоте. Процедуру модифицировали для повышения выхода 1-аминометилпирена (**NPyr**): добавили обработку аммиаком с получением осадка соли **NPyr** [179]. В ЯМР ^{1}H спектре наблюдается характеристичный синглетный сигнал протонов ацетат-аниона в области 1,86 м. д. и сигнал протонов метиленовой группы (4,51 м. д.).

Использование 1-аминометилпирена для дериватизации терпеновых трилактонов. Исходя из литературных данных, были выбраны несколько растворителей для проведения дериватизации: диоксан, изопропанол и толуол, а также катализаторов – соляная кислота, катионит КУ-1, трифторуксусная кислота. При проведении дериватизации использовали фракцию ТТЛ после

концентрации, содержание гинкголидов в котором увеличено примерно до 50 % [129]. Нагрев производили в колбах с винтовой крышкой, позволившим превысить пределы нагревания для растворителей. Обнаружение продуктов проводили методом масс-спектроскопии с использованием электроспрея для предотвращения фрагментации. При исследовании рассматривали только основные гинкголиды: **GA**, **GB**, **GC**. Результаты представлены в Приложении М.

Дериватизация ТТЛ 1-аминометилпиреном (**NPyr**) в абсолютном о-ксилоле или диоксане-1,4 вне зависимости от катализатора (п-толуолсульфокислоты или катионита КУ-1 в Н-форме) при длительном нагревании не происходила. В масс-спектрах реакционной массы, выдержанной при нагревании в течение 6 часов, наблюдались лишь пики молекулярных ионов исходных гинкголидов и билаболида (**BB**). Предположив критичность участия воды в процессе, далее проводили реакцию в 1М соляной кислоте. Для этого нагревали концентрированный экстракт с 2,5 кратным избытком 1-аминометилпирена (**NPyr**), отбирая аликвоты через 5, 11 и 14 часов после начала нагревания. Для каждой пробы наблюдали нарастание продуктов реакции и сохранение сигналов исходных гинкголидов через 5 и 11 часов. Через 14 часов уменьшалась интенсивность пиков продуктов реакции дериватизации на фоне присутствия пиков исходных ТТЛ. При детальном анализе образцов, отобранных через 5 и 11 часов, можно дать ориентировочную оценку глубины реакции в 80 %. При этом для гинкголида А конверсия была больше, чем для других ТТЛ, что выражается в более высокой интенсивности сигналов продуктов дериватизации и появлении данных сигналов в начале реакции в первой же пробе. Таким образом, достичь приемлемой глубины реакции дериватизации флуоресцентной меткой **NPyr** не получилось. Причиной можно считать стерические затруднения со стороны лактонных колец ТТЛ. Также не наблюдалось присоединение нескольких молекул 1-аминометилпирена (**NPyr**) к одной молекуле гинкголидов.

При использования изопропилового спирта присоединения метки к билобалиду (**BB**) и гинкголидам В, С не наблюдалось. При замене растворителя на менее полярный (бензол и толуол) и использовании кислотного катализа

удалось добиться присоединения аминометилпирена (**NPyr**) к гинкголидам A, B/J и билобалиду, но не наблюдалось аддукта с гинкголидом C. Использование в качестве растворителя толуола ускоряло реакцию, что выражалось в уменьшении интенсивности сигнала гинкголида A. Однако длительное нагревание приводило к появлению множества посторонних сигналов на фоне сохранения сигналов $[M-H]^-$ и $[M+Cl]^-$ гинкголидов B/J и C. Также не удалось установить молекулярную массу продукта билобалида, а исчезновение сигнала $[M-H]^-$ билобалида позволяет однозначно говорить о его превращении.

Двухстадийная дериватизация, включающая окисление гинкголидов. Последней попыткой получить аддукт терпеновых трилактонов с аминометилпиреном (**NPyr**) было использование нуклеофильного замещения. Для этой цели обратили внимание на гидроксильную группу у C3, которая есть во всех основных гинкголидах. Первая реакция является более привлекательной, так как в молекуле всех терпеновых трилактонов имеется только одна третичная спиртовая группа (Рисунок 34 A). Однако при использовании в качестве среды концентрированной серной кислоты возможны раскрытие лактона (Рисунок 34 B) и сульфирование 1-аминометилпирена. Вместе с тем протекание данной реакции не изменит флуоресцентные свойства пиренового цикла, и не является веской причиной для отказа от предложенного подхода.

Двухстадийная дериватизация, включающая получение гидразона пирена. Для преодоления стерического затруднения предположили использовать в качестве нуклеофильного агента гидразин (Рисунок 35).

Преимуществом данной реакции является простота и высокая скорость реакции гидразина, а также отсутствие дополнительной смены растворителя или нейтрализации избытка реагентов между двумя стадиями. В литературе описано получение гидразонов путем кипячения в этаноле в течение двух часов с гидратом гидразина. Реакция образования основания Шиффа возможна при комнатной температуре в том же растворителе [180].

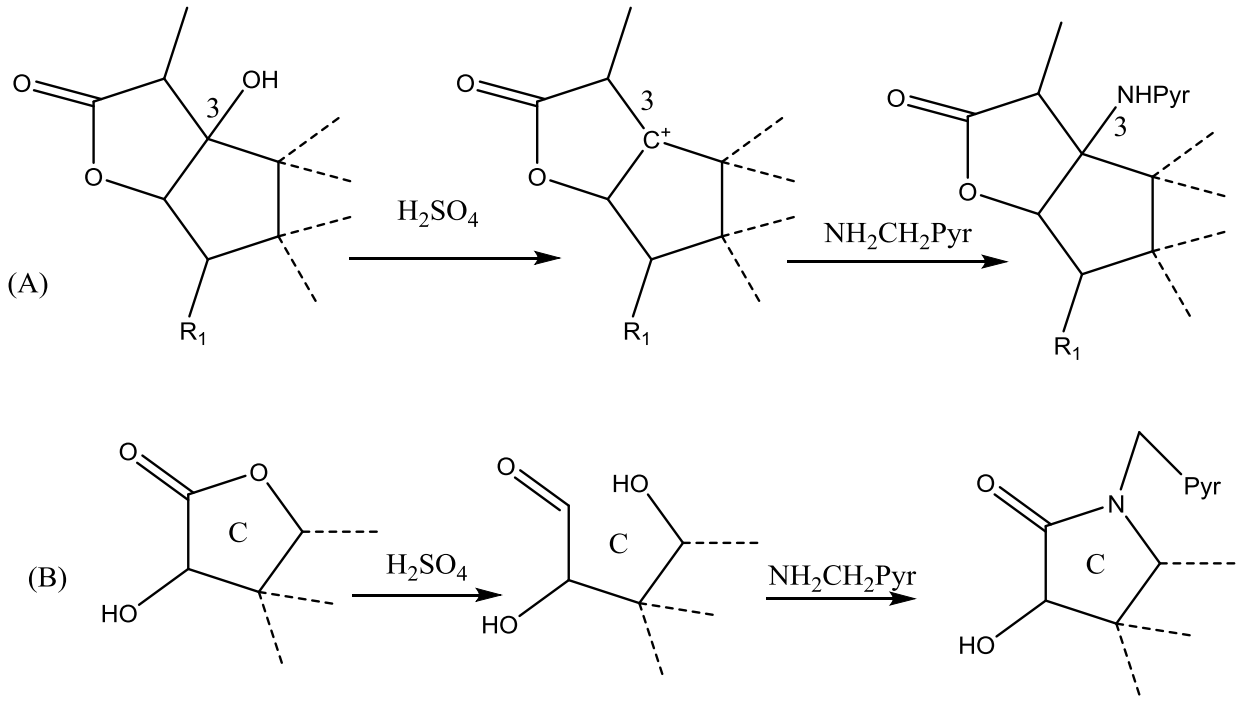


Рисунок 34 – Схема реакций получения продуктов аминирования (А) и дегидратации в среде серной концентрированной кислоты (В)

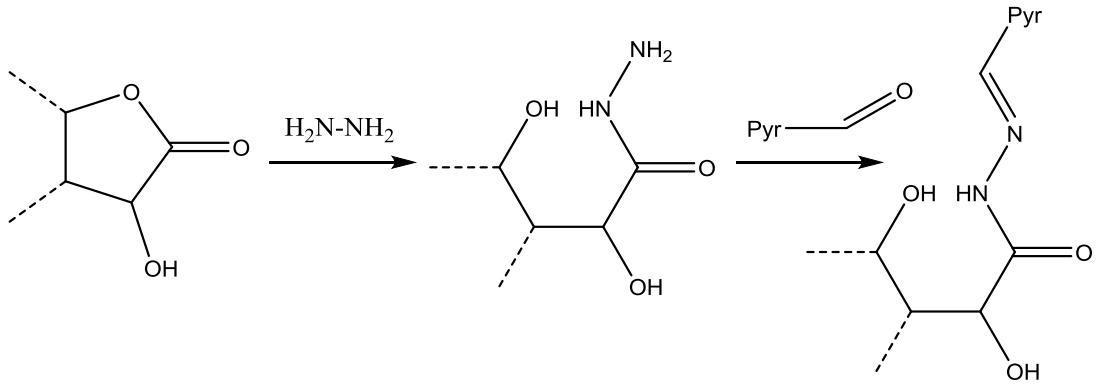


Рисунок 35 – Схема дериватизации ТТЛ через получение гидразона

Использование в качестве реакционной среды метанола при кипячении в течение 2 часов привело к появлению в реакционной массе гидразидов гинкголидов и билобалида. С помощью масс-спектрометрии обнаружили диаддукты гидразина для гинкголидов А, В и С и диаддукт воды и гидразина для билобалида. В отрицательном режиме ионизации масс-спектрометра обнаруживались пики молекулярных ионов исходных веществ, однако низкая интенсивность свидетельствовала о их следовой концентрации. Таким образом,

первая стадия реакции (Рисунок 35) протекает с почти полной конверсией терпеновых трилактонов в гидразид. Дополнительно реакционную массу оценили ВЭЖХ-DAD-MC(IS). Наибольшую реакционную способность проявляет гинкголид А: в реакционной массе преобладал продукт двойного присоединения гидразина к гинкголиду А ($[M+2N_2H_4+H]^+$). Также наблюдали продукты гинкголидов $[M+H_2O+H]^+$ и присоединения воды и гидразина одновременно ($[M+N_2H_4+H_2O+H]^+$) для других гинкголидов. При проведении реакции нуклеофильного присоединения в абсолютно безводных условиях очевидна разница в реакционной способности гинкголидов и билобалида. Был обнаружен новый продукт для билобалида, соответствующий сигналу $[M+2N_2H_4-2H_2O+H]^+$ (Рисунок 36).

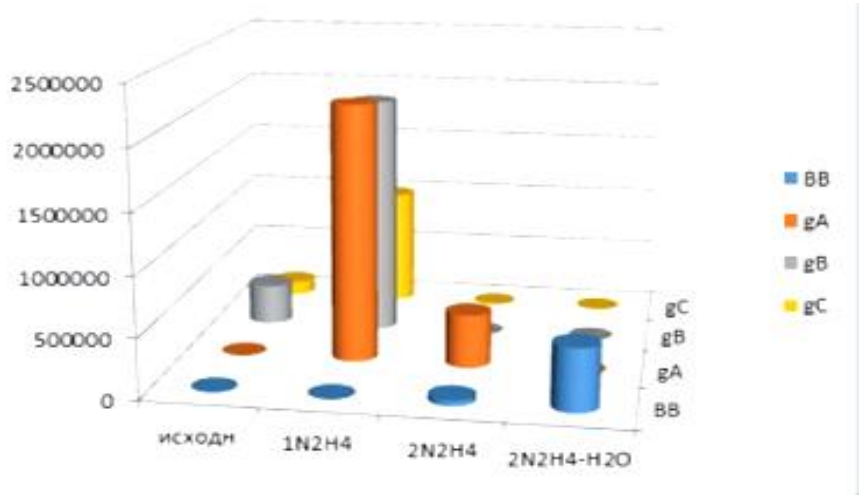


Рисунок 36 – Сравнение реакционной способности гинкголидов и билобалида между собой по результатам ВЭЖХ-МС(ESI). По шкале абсцисс – интегральная площадь под хроматограммой ионного тока для конкретного иона. Условные обозначения: BB – билобалид, gA, gB, gC – гинкголиды А, В и С соответственно

С целью упрощения пробоподготовки было предложено перевести пиренкарбальдегид в гидразон, который и будет использован в качестве реактива для дериватизации. Протекание реакции было доказано посредством масс-спектрометрии – фиксировался сигнал молекулярного иона гидразина $[M+H]^+ = 225{,}12$.

Полученный реагент использовали для дериватизации ТТЛ: исследовали одновременно (ВЭЖХ-УФ-ФЛ) и ВЭЖХ-МС. Сочетание двух методов позволило выявить сигналы флюоресцирующих веществ и установить их молекулярную массу (Рисунок 37). Наиболее интенсивные пики соответствуют гидразину пиренкарбальдегида (2,9 минуты), примеси альдоксима пиренкарбальдегида (3,7 минуты), а также не установленным примесям с молекулярной массой ниже 300 Д. Продуктов дериватизации гинкго не было обнаружено.

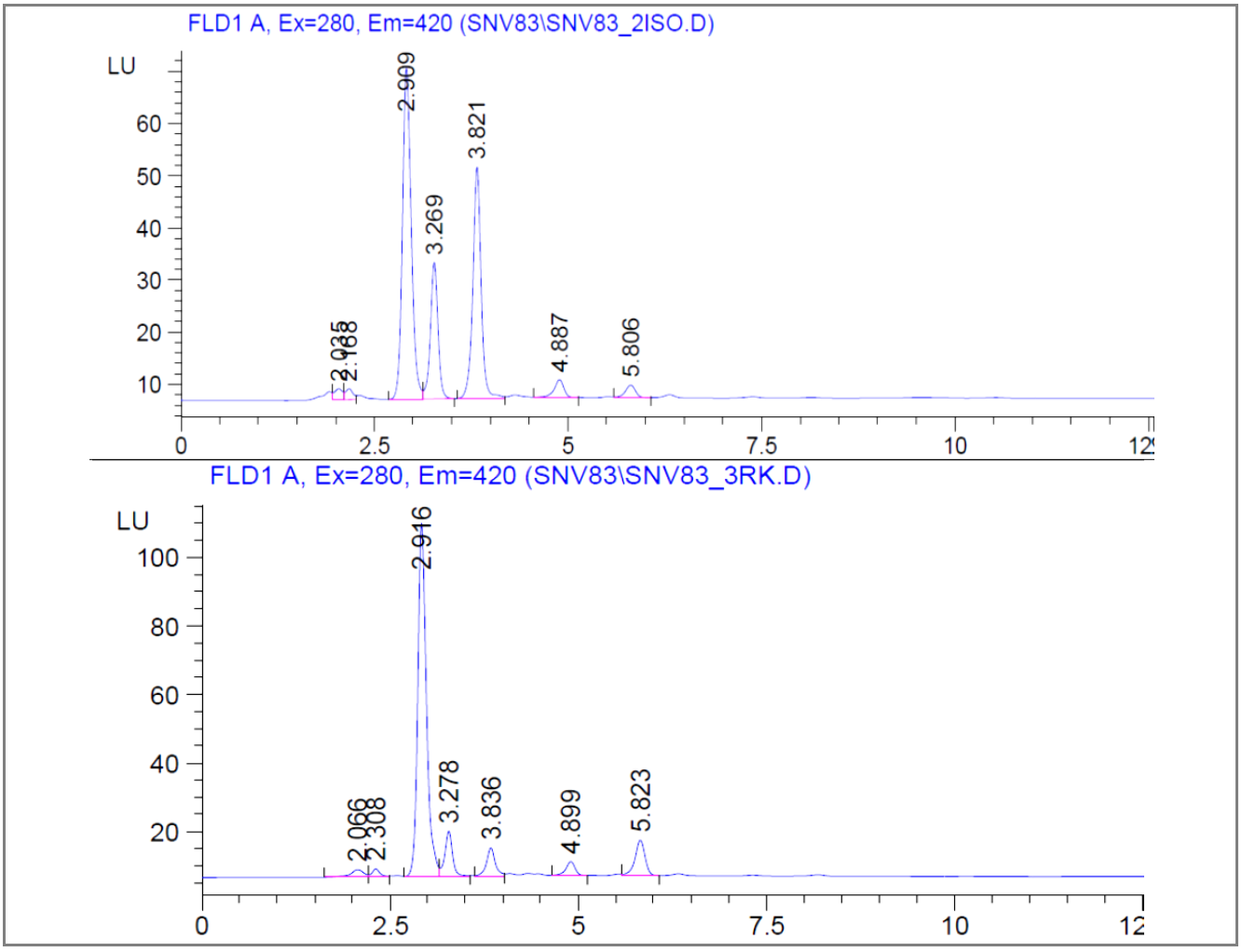


Рисунок 37 – Сравнение хроматограммы ВЭЖХ-ЛФ для исходного образца реагента (сверху) и реакционной массы после получения гидразона (снизу)

Таким образом, использование гидразина также нецелесообразно для дериватизации терпеновых трилактонов с целью количественного их определения. Следовательно, для ТТЛ рационально ставить методику ГЖХ-МС.

5.4. Выбор условий количественного определения флавоноидов и винпоцетина методом ВЭЖХ-УФ

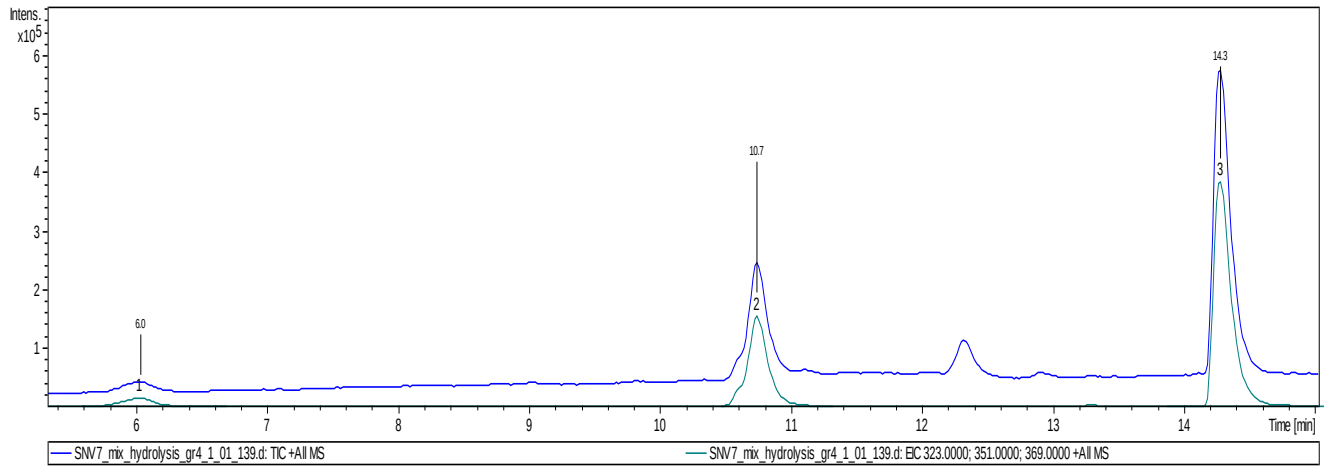
В литературе, освещающей оценку извлечений и экстрактов, в том числе и гинкго, приводятся в основном методики ВЭЖХ-УФ. В качестве метода количественного определения рассматривали возможность совместного количественного определения винпоцетина и агликонов флавоноидов – кемпферола, кверцетина и изорамнетина с помощью ВЭЖХ-УФ.

5.4.1. Оптимизация условий гидролиза флавоноидов экстракта листьев гинкго в присутствии винпоцетина

В качестве опорного метода использовали представленную в публикации методику гидролиза флавоноидов [108]. Поэтому для извлечения и дальнейшего гидролиза флавоноидов использовали смесь 1М соляной кислоты и изопропанола 1:1. Для проведения гидролиза полученную смесь нагревали при 90 °С в течение 30 минут. Смесь после гидролиза экстракта гинкго анализировали методикой ВЭЖХ-DAD-MC(ESI) с детектированием при 254 и 370 нм и фиксированием ионного тока при положительном режиме ионизации (хроматограмма приведена на рисунке 38).

Интенсивность пиков агликонов на хроматограмме с детекцией при 370 нм очень низкая, что также может свидетельствовать о неполном протекании гидролиза. На хроматограмме при 254 нм обнаруживаются дополнительные пики с массами 323,18 и 369,22, соответствующие аповинкаминой кислоте (**ImpE**), продукту гидратации винпоцетина (**ImpA**).

Так, в кислых условиях возможен гидролиз винпоцетина до аповинкаминовой кислоты; искали условия перевода винпоцетина в аповинкаминовую кислоту (**ImpE**). В литературе реакция гидролиза была описана как приводящая к аповинкаминовой кислоте, но при щелочном гидролизе [123]. Использование щелочи не позволит решить задачу определения одновременно суммы флавоноидов, так как для флавоноидов происходит раскрытие кумаронового цикла [180].



А

Б

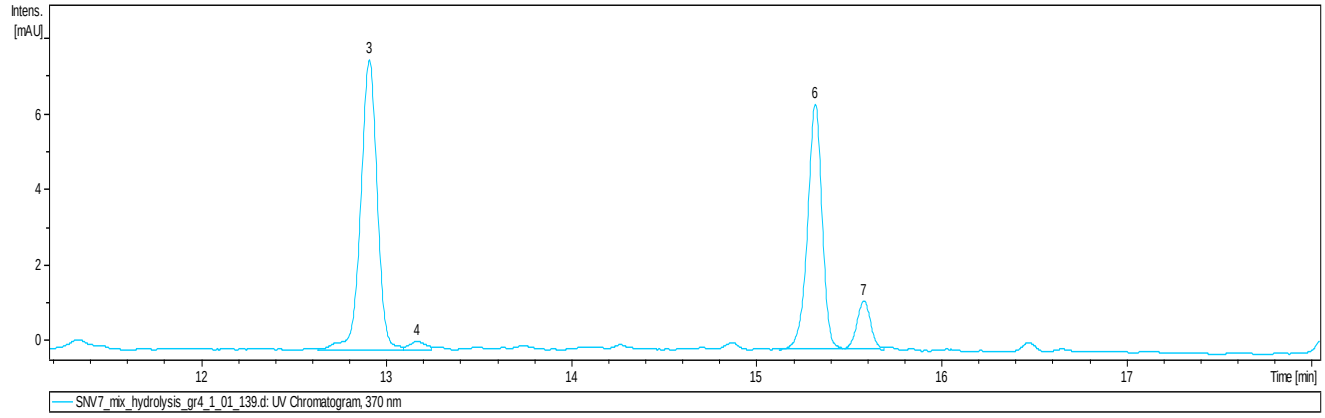


Рисунок 38 – Хроматограммы ВЭЖХ-УФ модельной смеси винпоцетина и экстракта гинкго (А) с детекцией при 254 нм, и одновременно ионным током и (Б) при 370 нм. Пики на хроматограмме при 254 нм: винпоцетин (3) и продукты его гидролиза (1) и гидрирования (2). Пики при детектировании на 370 нм: кверцетин (3), кемпферол (6) и изорамнетин (7). По оси у отложены миллиединицы оптической плотности

Предварительно проводили подбор условий хроматографического разделения винпоцетина при анализе его субстанции на основе литературных данных [108]. Путем последовательного изменения состава подвижной фазы был подобран градиентный режим, позволяющий отделить винпоцетин от его примесей и агликонов флавоноидов в одной пробе. В качестве подвижной фазы была выбрана смесь 0,1%-й муравьиной кислоты с ацетонитрилом (режим приведен в таблице 37).

Т а б л и ц а 3 7 – Градиентный режим для идентификации винпоцетина

Время от начала анализа, мин	**Доля ацетонитрила в подвижном растворителе, %**	**Условия**
0	15	0,1%-я муравьиная кислота и ацетонитрил. Детекция 254, 280 нм. Колонка Agilent Zorbax XDB C18 150×4,6 5µм. Объем пробы 100 мкл
2,5	15	
10	30	
15	45	
20	90	
25,5	15	
30	15	

С целью выбора условий гидролиза субстанцию винпоцетина растворяли в смеси изопропанола и 0,1М соляной кислоты и нагревали при 90 °С. На хроматограммах, объеденных с учетом неудерживаемого объема и задержки между детекторами (Рисунок 39) отмечались вещества с молекулярной массой 323,1741 (аповинкаминовая кислота, примесь Е), 369,2150 (продукт гидратации, примесь D). Данные соединения описаны как примеси к винпоцетину в нормативной документации и статьях [181, 182]. Однако был обнаружен дополнительный сигнал с массой молекулярного иона 365,26, соответствующего продукту переэтерификации винпоцетина с изопропиловым спиртом (изопропилаповинкаминат Imp*). Формирование данного вещества четко показывает протекание побочных реакций непосредственно в реакционной массе.

Таким образом, приведенная методика позволяет отделить и идентифицировать примесь D и примесь Е (аповинкаминовая кислота) – контролируемые примеси для таблетированных форм. Дополнительно в пользу пригодности данной методики говорит разделение продукта переэтерификации винпоцетина – изопропилаповинкоминат (Imp*).

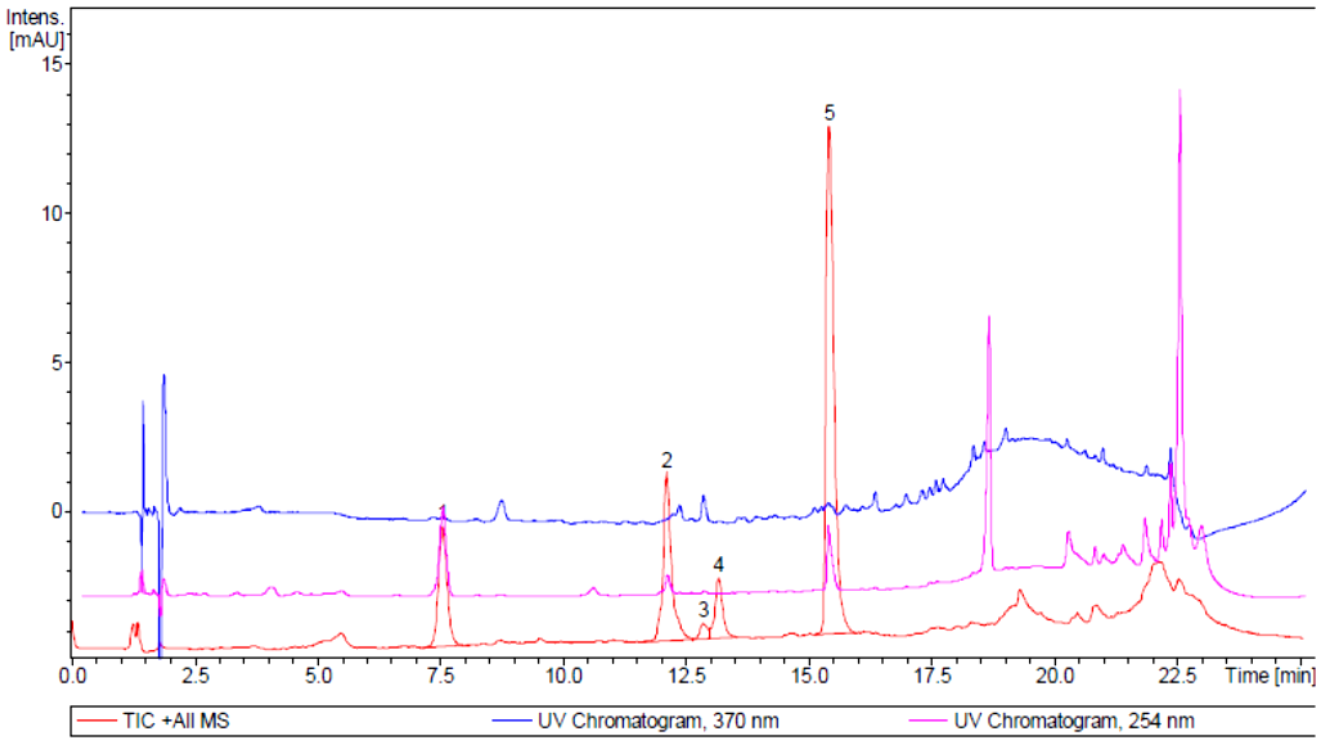


Рисунок 39 – Хроматограмма образца субстанции винпоцетина после кислотного гидролиза при извлечении смесью ИПС: соляная кислота. $[M+H]^+$: 1 – 323,1741, rt 7,5 мин; 2 – 369,2150, rt 12,1 мин; 3 – 367,1979, rt 12,8 мин; 4 – 426,1714, rt 13,2 мин; 5 – 351,2064, rt 15,4 мин. По оси y отложены миллиединицы оптической плотности

Экстрагент заменили на смесь этанола и 0,1 н соляной кислоты 1:1. Гидролиз проводили при 90 °С и отбирали пробы через 30 минут, 1 и 1,5 часа. Анализ проводили методикой ВЭЖХ-УФ при нескольких длинах волн (Рисунок 40).

По результатам сравнения хроматограмм было выбрано время гидролиза около 1,5 часов. Также анализ хроматограммы ионного тока позволил отнести пики винпоцетина ($[M+H]^+$ 351,21), аповинкаминовой кислоты (ImpE, $[M+H]^+$ 323,17) и гидратированного винпоцетина (ImpA, $[M+H]^+$ 369,22).

Из-за протекания побочных реакций от совместного анализа винпоцетина и агликонов флавоноидов пришлось отказаться. Было решено проводить контроль качества в два этапа – вначале определять количество винпоцетина без использования гидролиза, а затем сумму агликонов после кислотного гидролиза.

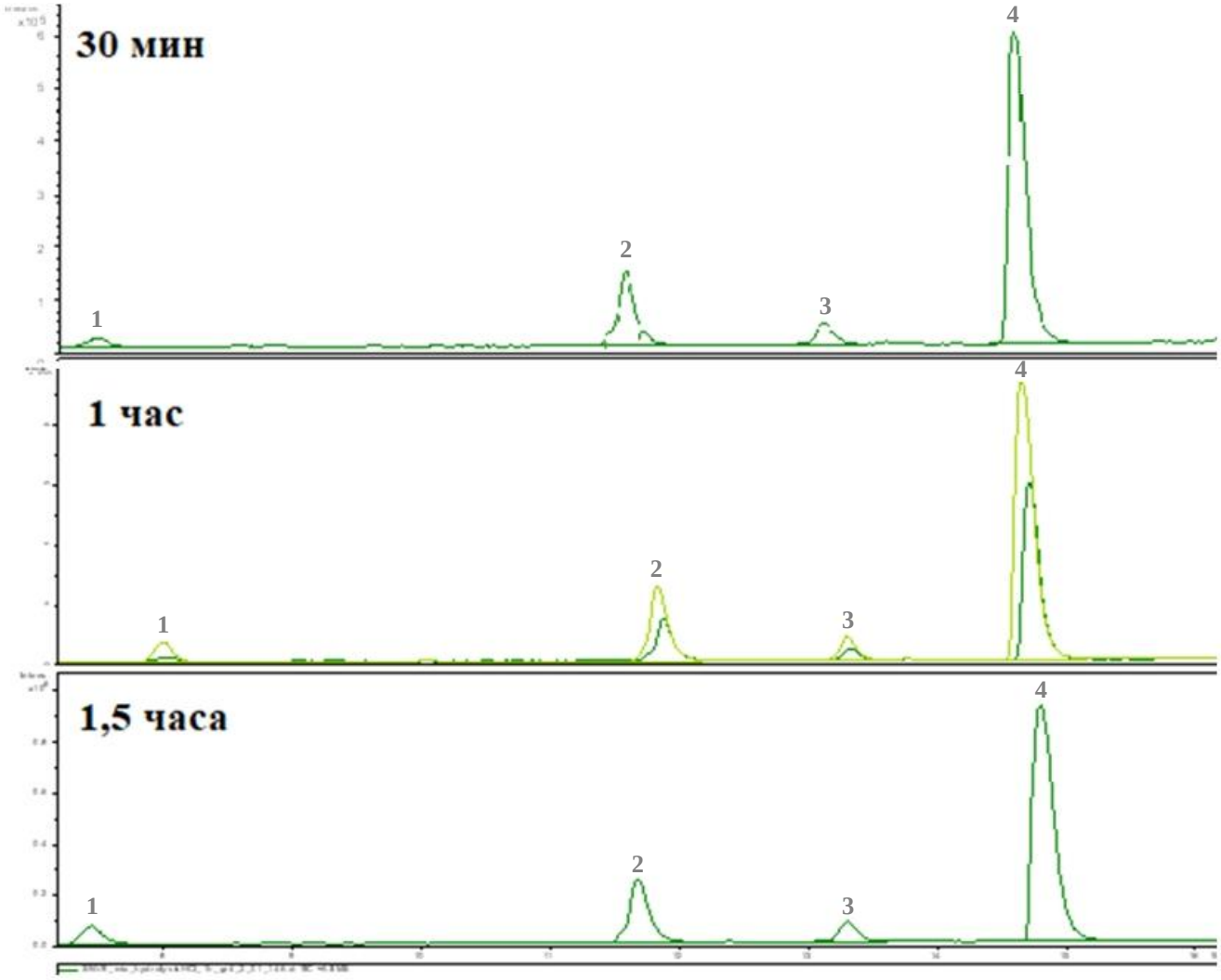


Рисунок 40 – Сравнение интенсивности и количества пиков винпоцетина и его продуктов в зависимости от продолжительности кислого гидролиза. Соответствие пиков и веществ по молекулярной массе: 1 – 323,1763 (сигнал аповинкаминовой кислоты), 2 – 369,2185 (сигнал гидратированной формы), 4 – 351,2083 (сигнал винпоцетина). По оси у отложены миллиединицы оптической плотности

5.4.2. Разработка метода с использованием внутреннего стандарта

Далее выбирали способ количественного определения, а именно – рассмотрению возможности применения внутреннего стандарта. Наиболее рациональным показалось использовать внутренний стандарт для определения винпоцетина, так как это позволит сократить время анализа и затраты на его проведение. Основываясь на предположении о схожести функциональных групп и близости поведения при хроматографическом разделении были предложены

кандидаты в качестве внутренних стандартов: кофеин (CF), папаверин (PP) и дротаверин (Dr) (Рисунок 41).

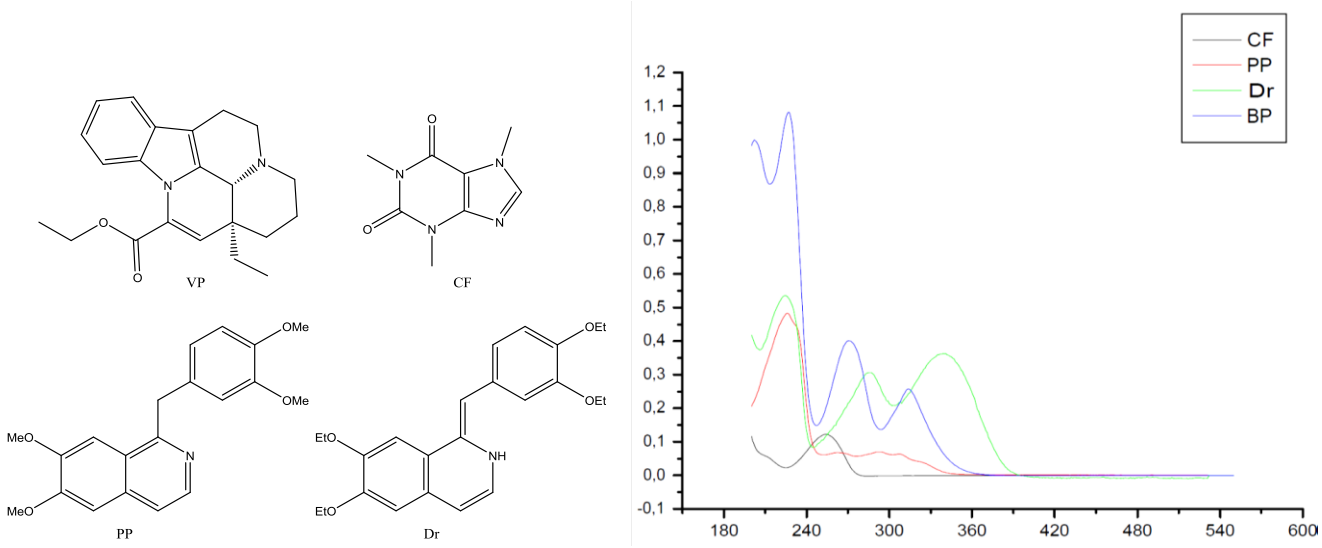


Рисунок 41 – Сопоставление структур винпоцетина и кандидатов в качестве внутреннего стандарта (слева) и сравнение спектров поглощения веществ-стандартов и винпоцетина: CF – кофеин, PP – папаверин, Dr – дротаверин, VP – винпоцетин. Концентрация 10–5 моль/л. По оси y отложены единицы оптической плотности

Вещество, используемое для внутреннего стандарта и аналит должны иметь близкие значения коэффициента экстинкции при длине волны, на которой происходит детектирование. Поэтому сравнивали спектры поглощения приведенных выше веществ в системе растворителей ацетонитрил : вода 35:65.

Значения удельного поглощения идентичные винпоцетину имеет дротаверина гидрохлорид. Поэтому именно его выбрали в качестве внутреннего стандарта при анализе винпоцетина.

Так как дротаверин представляет собой простой эфир гидрированного производного изохинолина и не подвержен гидролизу, то было выдвинуто предположение о его пригодности в качестве стандарта и для агликонов флавоноидов. С целью проверки этого предположения проводили гидролиз смеси рутина и дротаверина гидрохлорида в качестве модели веществ при анализе. Результаты представлены на хроматограмме (Рисунок 42).

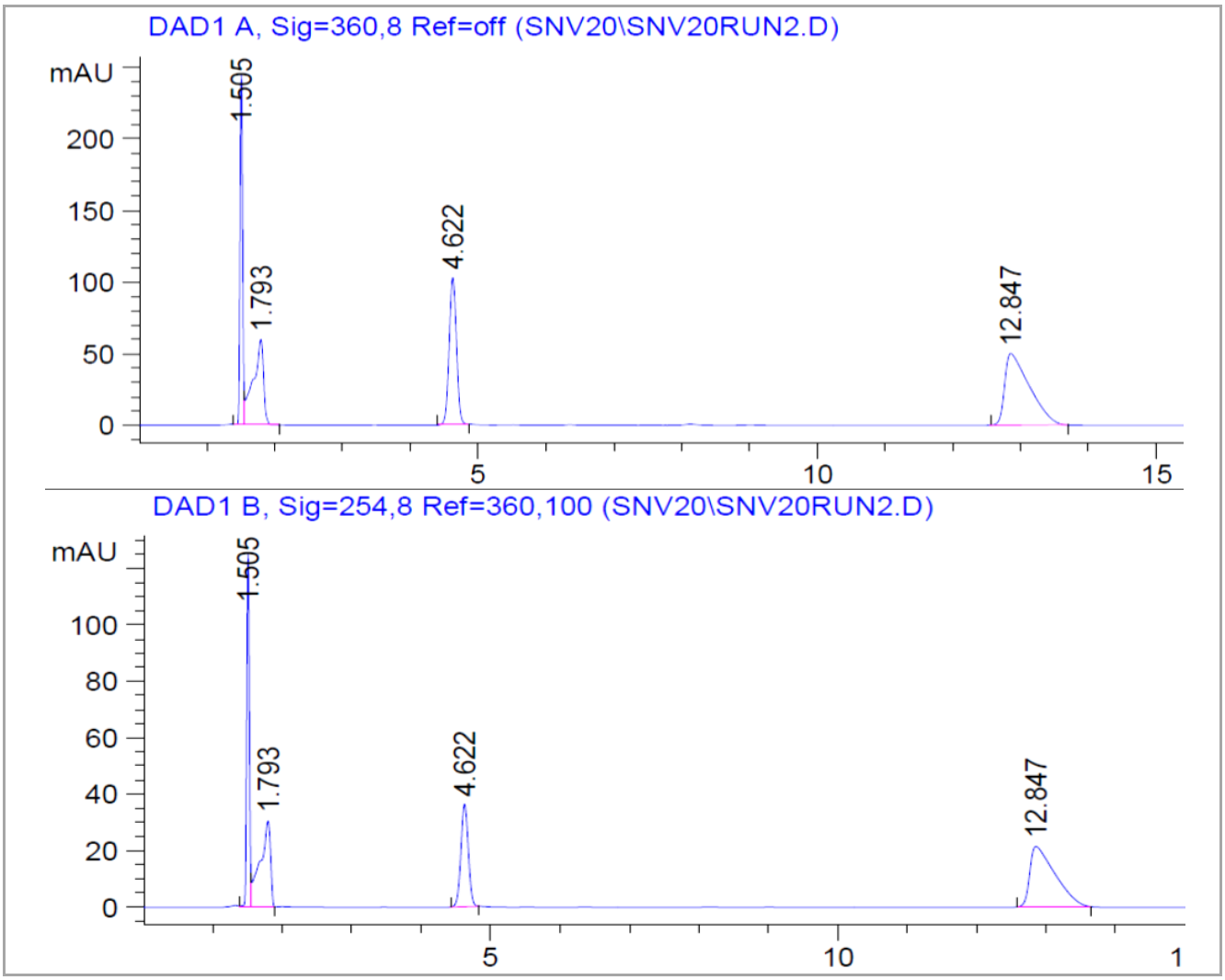


Рисунок 42 – Хроматограммы смеси рутина и дротаверин после 2 часов гидролиза при двух длинах волн (360 нм сверху и 254 нм снизу). Подвижная фаза – ацетонитрил : 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в соотношении 35:65

Из представленных хроматограмм видно, что разделение агликона рутина и дротаверина происходит достаточно хорошо. Однако большая асимметрия пика дротаверина затрудняет использование данной методики для количественного анализа. Переход с раствора муравьиной кислоты на фосфатный буфер с pH 4,5 позволил избавиться от асимметрии пика стандарта.

Хроматографическое поведение дротаверина было также близко к таковому винпоцетина. Разделение в системе ацетонитрил : вода (35:65) при изократическом режиме составило 1,43. Однако форма пиков сильно отличалась от нормального распределения (коэффициент асимметрии пика на уровне 10 %

высоты составил 2,75 для винпоцетина и 3,0 для дротаверина, допустимое значение допускается от 0,8 до 1,5 [133]). Поэтому было необходимо изменить подвижную фазу посредством замены воды на буферный раствор. Наиболее стабильные результаты удалось получить при использовании фосфатного буфера с pH 4,5. В системе, состоящей из 45 % фосфорного буфера с pH 4,5 и 55 % ацетонитрила, разделение составило 1,34, а коэффициенты асимметрии – 1,0 для обоих веществ.

Таким образом, в случае проведения отдельного хроматографического определения винпоцетин и агликонов флавоноидов может быть проведено ВЭЖХ-УФ с использованием фосфатного буфера с pH 4,5 и ацетонитрила в качестве подвижной фазы. Условия разделения приведены в таблице 38.

Таблица 38 – Режимы хроматографического разделения для винпоцетина и агликонов флавоноидов

Показатель	**Определяемый компонент**	
	Винпоцетин	**Агликоны флавоноидов**
Режим	Изократический	
Состав подвижной фазы	Ацетонитрил: фосфатный буфер 45:55	Ацетонитрил: фосфатный буфер 35:65
Детектирование	218, **254** и 280 нм	254, 360 и **370 нм**
Колонка	Agilent Zorbax XDB C18 150×4,6 5µм	
Температура колонки	35 °C	

5.4.3. Разработка метода пробоподготовки

Извлечение в обоих анализах готовится на смеси спирта этилового (или изопропилового) с 0,1М соляной кислотой. Для винпоцетина кислая среда способствует полноте извлечения и служит реагентом в последующем гидролизе флавоноидов. Также оба анализа могут быть проведены с использованием одного и того же стандарта – дротаверина гидрохлорида. Поэтому можно разработать общую тактику пробоподготовки таким образом, чтобы сократить суммарное

количество процедур для анализа формы по обоим показателям (содержанию винпоцетина и сумме флавоноидов, рисунок 43).

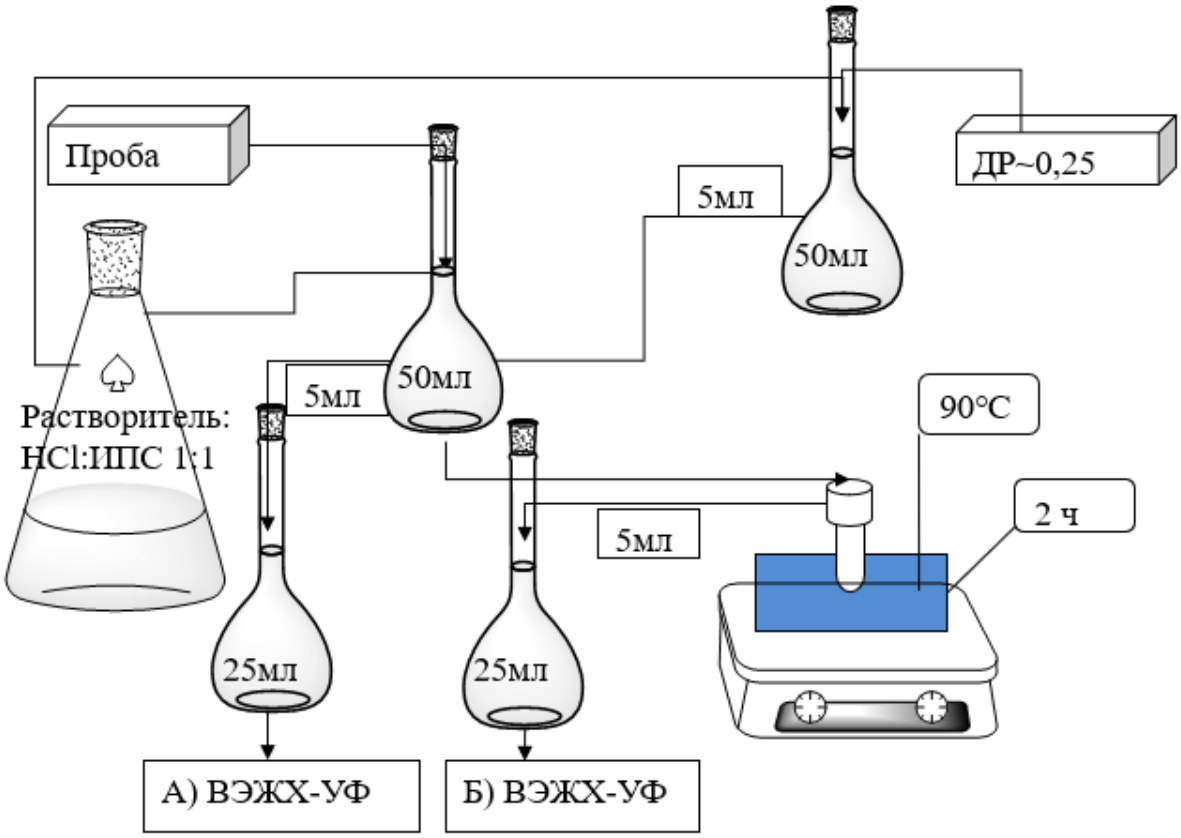


Рисунок 43 – Схема подготовки проб для анализа винпоцетина (А) и суммы флавоноидов (Б)

Особенностью подготовки пробы было внесение аликвоты раствора стандарта в первый раствор до доведения его до заданного объема 50 мл. После приготовления первого раствора 5,0 мл разводили до 25 мл тем же растворителем и анализировали по средствам ВЭЖХ-УФ для определения содержания винпоцетина. Оставшийся раствор подвергали нагреванию в течение 2 часов при 90 °С. Из пробы после гидролиза отбирали 5 мл и разводили до 25 мл. Полученный раствор анализировали ВЭЖХ-УФ для определения количества флавоноидов.

Пригодность предложенной схемы пробоподготовки и всей совокупности как методики для стандартизации проверялась в ходе экспериментов для частичной валидации.

5.4.4. Валидация методики стандартизации препарата

Методика для количественного определения действующих веществ в составе лекарственного препарата должна соответствовать требованиям по ряду показателей. В ходе проведенных исследований проверялась специфичность хроматографического разделения и детектирования, воспроизводимость определения действующих веществ, линейность.

Оценка специфичности методики. Общепринятым является подход доказательства специфичности методики по результатам анализа смеси вспомогательных веществ без действующих компонентов. На хроматограмме (детекция при 254 и 360 нм) не было обнаружено сигналов, кроме внутреннего стандарта (Рисунок 44).

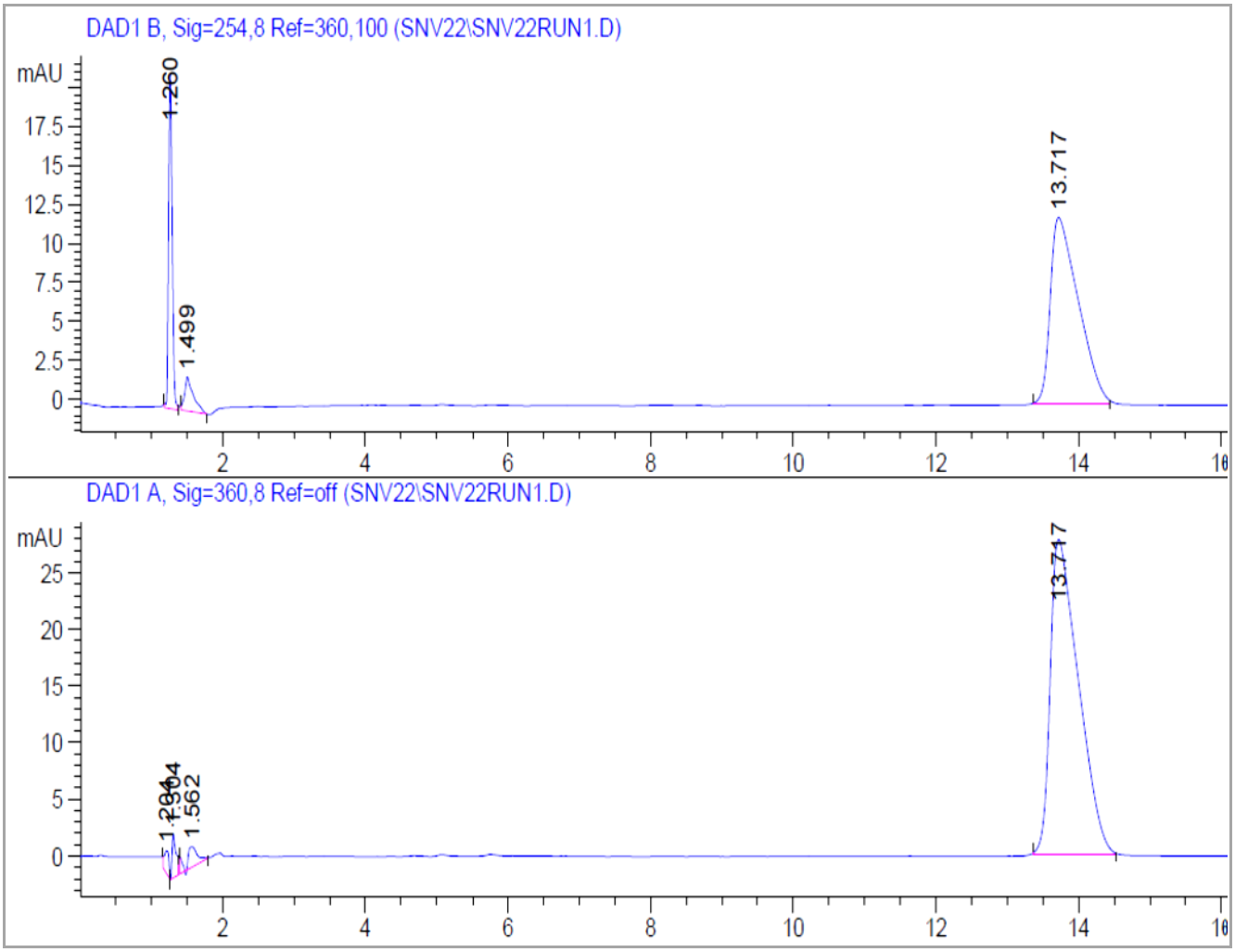


Рисунок 44 – Специфичность методики хроматографического разделения. 13,717 мин – пик дротаверина (стандарта)

Линейность. Линейность методики оценивали в пределах от 80 до 120 % от номинального содержания действующих веществ. Готовили три модельные смеси, содержащие 80,100 и 120 % от номинального содержания винпоцетина и экстракта гинкго соответственно. Определение проводили трехкратно, результаты представлены в таблицах 39 и 40.

Т а б л и ц а 3 9 – Результаты испытаний по определению линейности методики анализа винпоцетина

Содержание винпоцетина в навеске модельной смеси, мг	**Площадь пика при разных длинах волн**		
	254 нм	**280 нм**	**318 нм**
17,1	256	446	359
18,3	283	492	396
22,9	360	626	505
Коэффициент аппроксимации	0,996	0,895	0,895

Т а б л и ц а 4 0 – Результаты испытаний по определению линейности методики анализа агликонов флавоноидов

Содержание экстракта гинкго в навеске, г	**Интегральная площадь пиков при разных длинах волн**					
	Кверцетин		**Изорамнетин**		**Кемпферол**	
	360 нм	**370 нм**	**360 нм**	**370 нм**	**360 нм**	**370 нм**
0,11012	392	426	119	130	350	436
0,11962	379	413	120	130	347	356
0,14895	465	506	148	161	425	436
Коэффициент аппроксимации	0,869	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920

Согласно современным представлениям, коэффициент аппроксимации, превышающий 0,99, является приемлемым для методики количественного определения. Следовательно, линейность предложенной методики при условии детектирования при 254 нм для количественного определения винпоцетина достаточна. В случае агликонов линейность была ниже, чем 0,99. Однако значение 0,92 приемлемо для количественного определения с учетом проведения гидролиза пробы.

Воспроизводимость. Косвенной характеристикой правильности может служить изменение площади пика сигнала вещества на хроматограмме. Общий вид хроматограмм представлен на рисунке 45.

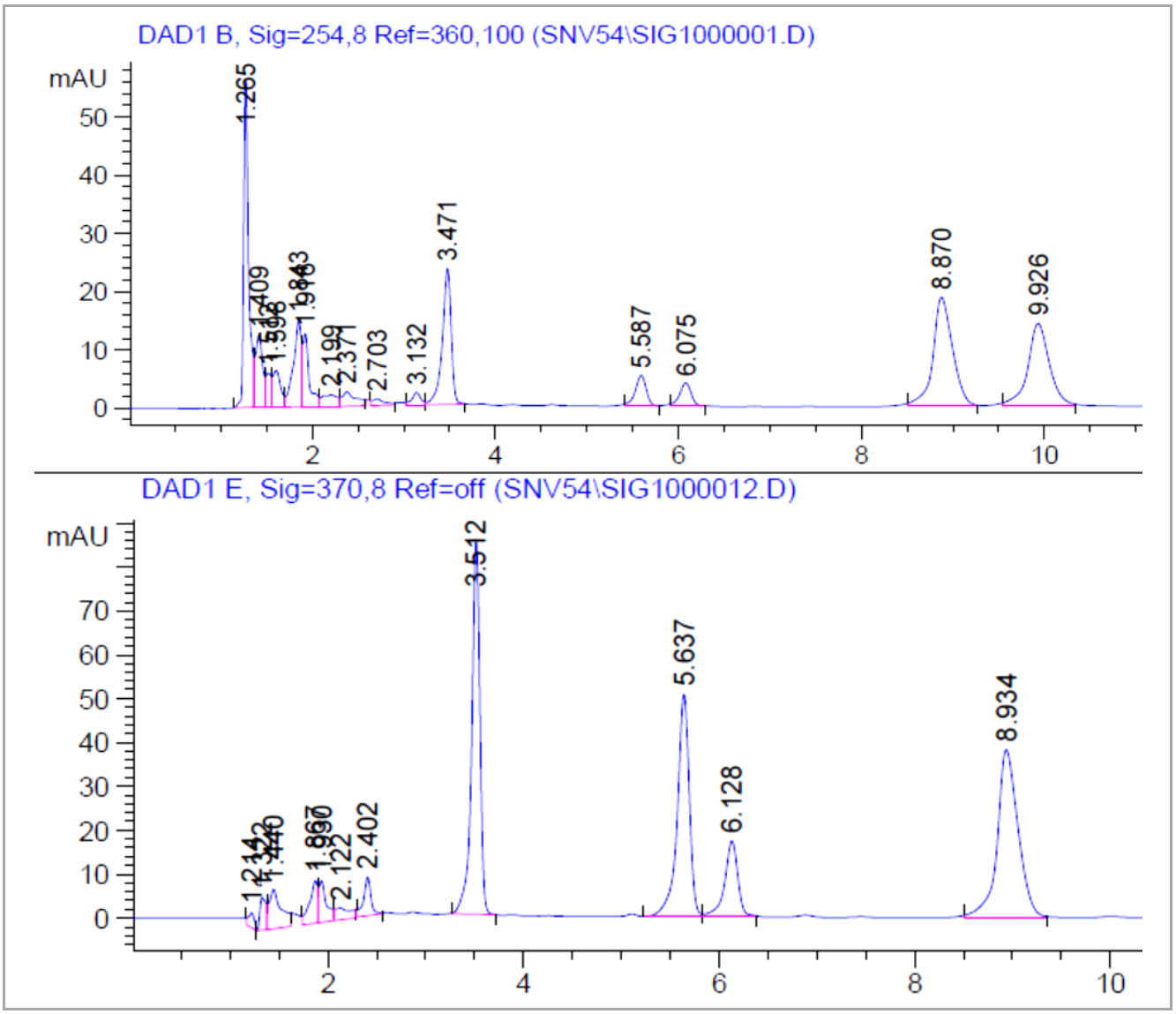


Рисунок 45 – Хроматограммы, полученные при анализе воспроизводимости методик при разных длинах волн: 254 нм (слева) и 370 нм (справа)

С целью выявления воспроизводимости проводили повторный анализ модельных смесей, соответствовавших по составу всем трем концентрациям дважды с перерывом пять дней. Каждый образец анализировали трехкратно, затем находили среднеквадратичное отклонение для каждого анализа и раздельно для каждой длины волны. Результаты приведены в таблицах 41 и 42.

Таблица 41 – Среднеквадратичное отклонение в каждом анализе винпоцетина относительно разных длин волн детектирования

Содержание винпоцетина, мг	**254 нм**	**280 нм**	**318 нм**
22,9	2,21	8,22	4,86
20,3	0,81	1,87	1,30
17,0	0,54	1,01	0,80
22,9	0,55	1,34	0,97
18,3	0,67	1,37	0,80
17,1	1,81	3,21	1,29
Среднее	1,10	2,84	1,67

Из приведенных результатов видно, что детектирование при разных длинах волн дает разную ошибку определения. На основании сравнения можно сделать вывод об использовании для анализа винпоцетина 254 нм, в то время как агликоны следует анализировать путем регистрации поглощения при 370 нм.

Таблица 42 – Среднеквадратичное отклонение в каждом анализе флавоноидов относительно разных длин волн детектирования

Содержание экстракта, г	**370 нм**			**360 нм**		
	Q	**Ir**	**K**	**Q**	**Ir**	**K**
0,127	0,77	0,34	1,46	1,01	0,40	1,16
0,119	0,12	0,06	1,61	0,10	0,05	1,62
0,136	1,37	0,46	1,06	1,07	0,44	1,15
0,149	0,18	0,04	0,06	0,11	0,09	0,05
0,120	0,45	0,66	0,61	0,47	0,52	0,57
0,110	21,33	0,42	1,36	2,03	0,69	0,84
Среднее	4,04	0,33	1,03	0,80	0,37	0,90
Примечание – Q – кверцетин, Ir – изорамнетин, K – кемпферол						

Кроме того, достаточно низкое значение СКО при использовании вышеозначенных длин волн позволяет говорить о хорошей воспроизводимости метода.

5.4.5. Приемлемость внутреннего стандарта

В ходе определения некоторых валидационных характеристик также было необходимым доказать возможность применения дротаверина в качестве внутреннего стандарта на обоих этапах анализа. С этой целью сравнивали соотношение количества вещества и стандарта с интегральной интенсивностью их пиков на хроматограммах. Соотношение количества веществ составило для винпоцетина и дротаверина 0,74, в то время как соотношение интегральных площадей – 0,76 при длине волны детектирования 254 нм.

Следующим вопрос заключался в сохранении концентрации дротаверина в процессе гидролиза. Сравнив интегральную интенсивность сигналов в хроматограммах до и после гидролиза, находили изменение площади пика в процентах (Таблица 43).

Таблица 43 – Сохранение интегральной интенсивности сигнала дротаверина после гидролиза проб

Длина волны детектирования	**254 нм**	**280 нм**	**318 нм**	**360 нм**	**370 нм**
Среднее отклонение по модулю, %	4,87	4,00	3,86	4,13	3,98
СКО	0,97	4,32	4,93	5,33	5,04

Интегральная интенсивность сигнала при 254 нм сохраняется в пределах 1 %, в то время как при других длинах волн наблюдается тенденция к увеличению площади пика. Причиной такого изменения может быть наложение продуктов гидролиза флавоноидов, имеющих близкие к данным значениям максимумы поглощения. Сохранение интегральной интенсивности при детектировании на длине волны 254 нм в пределах 15 свидетельствует о сохранении количества дротаверина и, таким образом, доказывает приемлемость его в качестве стандарта на обоих этапах стандартизации. С целью выявления приемлемости и целесообразности предложенной схемы стандартизации приведем сравнение ее с методиками ВЭЖХ-УФ, описанными в литературных источниках (Таблица 44).

Т а б л и ц а 4 4 – Сравнение метрологических характеристик предложенной методики и опубликованной в научной литературе

Метрологические характеристики	**Разработанная методика**		**Литературные данные**	
	винпоцетин	**флавоноиды**	**винпоцетин**	**флавоноиды**
Длина волны детектирования, нм	254	370	311	360
Воспроизводимость, %	–	–	Внутридневная 100,2–104,7	95 – для кверцетина, 80 – для кемпферола
			Междневная 100,1–106,3	
СКО, %	1,10	Кверцетин – 4,04; изорамнетин – 0,33; кемпферол – 1,03	3,38	–
Линейность R^2	0,996	0,920	0,9998	0,999
Диапазон концентраций слинейным откликом	68,6–92,4 мкг/мл	0,12–0,14 мг/мл	2,4 до 240 нг/мл	–

Как видно из таблицы 44, предложенный метод уступает по универсальности (а именно по ширине диапазона линейности), но превосходит по точности, ранее опубликованные методики ВЭЖХ-УФ количественного определения. Следовательно, разработанный подход в совокупности точности и минимизации подготовительных процедур более подходит для анализа лекарственных препаратов.

Основываясь на полученной спецификации, проводили определение срока годности ЛП. Разработанная методика использовалась для определения сохранности веществ после хранения (Приложение Н). Срок годности по результатам анализа может быть установлен в 2 года.

5.5. Разработка спецификации на готовый продукт

Ранее были выбраны показатели, требующие особого внимания: «Описание», «Количественное определение», «Растворение». Отдельно стоит обратить внимание на методики оценки Родственных примесей.

Так, обязательными для включения, согласно фармакопее ЕАЭС буду показатели «Описание», «Подлинность», «Микробиологическая чистота», «Количественное определение». Показатели «Маркировка» и «Упаковка» вынесены из спецификации из-за большой зависимости от производственной линии конкретного производителя.

Показатель «Описание» предложено включить описание формы и внешнего вида. Форма таблетки – плоскоцилиндрическая с диаметром 9 мм, с фаской и риской. Таблетки имели бежево-коричневую окраску с неоднородностью поверхности по цвету. На сломе окраска таблеток идентична по окраске и неоднородности на поверхности. В спецификацию вносятся в виде формулировки «Круглые плоскоцилиндрические таблетки светло-коричневого цвета с вкраплениями, с риской и фаской, с характерным запахом, 9 мм. Линия разлома (риска) не предназначена для разделения таблетки».

В качестве идентификации действующих веществ безальтернативной методикой становится ВЭЖХ-УФ [183]. В последние десять лет все больше авторов сходятся на том, что в качестве идентификации действующих веществ экстрактов следует включать методики ВЭЖХ [184, 185, 186]. Для экстрактов из лекарственного растительного сырья характеристичным будет соотношение агликонов, поэтому для показателя «Подлинность» (Идентификация) разумно будет ввести методику ВЭЖХ-УФ ФиВн, используемую для количественного определения как винпоцетина, так и экстракта гинкго, и требование о соответствии времени удерживания.

Показатель «Растворение» может быть определен по наименее растворимому веществу. Рационально проводить определение по винпоцетину. При этом может быть использована методика для количественного определения (ВЭЖХ-УФ ФиВн).

Для оценки «Родственных примесей» может быть использована методика ВЭЖХ-УФ в градиентном режиме (методика РП). Для таблеток винпоцетина описаны примеси аповинкамин (примесь B, CAS 4880-92-6) и продукт гидратации (примесь A, CAS 68780-78-9). В субстанции винпоцетина также описаны

метоксивинпоцетин (примеси C, CAS 70155-05-4) и дигидровинпоцетин (примесь D) (ФС.2.1.0076, рисунок 46). Ранее была показана пригодность методики ВЭЖХ в градиентном режиме для разделения этих примесей.

«Однородность дозирования» в случае смеси извлечения и/или компонентов лекарственного растительного сырья и химического вещества оценка однородности распределения химического вещества крайне необходима [185, 186]. Согласно ОФС.1.4.2.0014.15 при содержании химического вещества менее 25 мг на таблетку требуется количественное определение в отдельных таблетках (метод 1, ОФС.1.4.2.0014.15). При этом необходимо оставить однородность массы. Нормативное содержание – ±7,5 % (масса таблетки 280 мг).

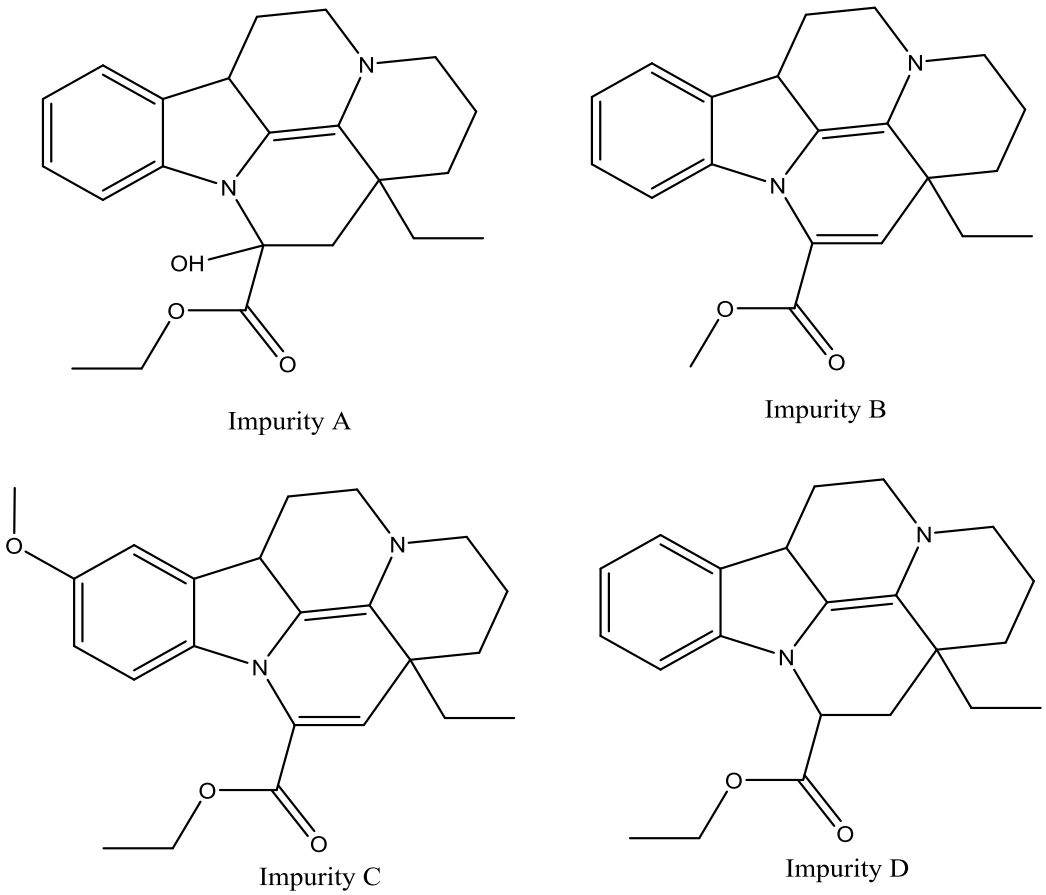


Рисунок 46 – Примеси, описанные для таблеток (примесь A и B) и для субстанции винпоцетина

В результате спецификация на готовые таблетки будет иметь вид как в таблице 45.

Таблица 45 – Спецификация на готовую продукцию

Наименование предприятия		Спецификация	Номер	Стр. ___ из ___ стр.
		Подразделение: отдел контроля качества	Дата введения	Версия
		Экстракт гинкго и винпоцетин, таблетки 62 мг + 10 мг		
№ п/п	**Параметры**	**Нормы по НД**		**Ссылки на методики**
1	Описание	Круглые плоскоцилиндрические таблетки светло-коричневого цвета с вкраплениями, с риской и фаской, с характерным запахом. Линия разлома (риска) не предназначена для разделения таблетки		ГФ 15 ОФС.1.4.1.0015.18 «Таблетки»
2	Подлинность/ Идентификация	На хроматограмме, полученной для количественно определения агликонов времена удерживания должны совпадать с временами удерживания хроматограмм стандартов (кемпферола, изорамнетина и кверцетина). На хроматограмме для количественного определения винпоцетина время удерживания должно совпадать с временем удерживания на хроматограмме стандартного образца винпоцетина		ВЭЖХ-УФ, (Методика ФиВн)
3	Растворение	За 45 минут количество винпоцетина, высвободившегося в среду растворения, не менее 75 %		ГФ 15 ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм», ВЭЖХ-УФ (винпоцетин, Методика ФиВн)
4	Родственные примеси	• Примесь А винпоцетина – не более 0,6 %; • примесь В винпоцетина – не более 0,5 %; • любая другая (единичная неидентифицированная) примесь – не более 0,3 %		ВЭЖХ-УФ (Методика РП)
5	Однородность дозирования	Согласно ОФС		ГФ 15 ОФС.1.4.2.0001.15 «Однородность дозирования», метод 1, Методика ФиВн

Продолжение таблицы 45

№ п/п	Параметры	Нормы по НД	Ссылки на методики
6	Однородность массы	259–301 мг	ОФС.1.4.2.0002.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм»
7	Микробиологическая чистота	· Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл); · общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл); · отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл)	ГФ 15 ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота»
8	Количественное определение	·Содержание винпоцетина – 9–11 мг; ·содержание суммы флавоноидных гликозидов в пересчете на кверцетин – не менее 14,08 мг и не более 17,28 мг	ВЭЖХ-УФ (Методика ФиВн)
9	Стеарат магния	Не более 1 %	ОФС.1.4.1.0015.18 «Таблетки»

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

При разработке методов стандартизации готовой таблетированной формы была проведена оценка приемлемости флуориметрии как напрямую, так и после дериватизации флуоресцентным реагентом. Прямая флуориметрия не пригодна для компонентов ЛП из-за невыраженной флуоресценции винпоцетина и узкого диапазона линейности.

В качестве потенциальных реакций для получения флуоресцирующего деривата рассматривали аммонолиз лактонов ТТЛ флуоресцентными реагентами – 1-аминометилпиреном и/или гидразином с последующим получением основания Шиффа. Впервые была рассмотрена схема двухшаговой дериватизации через аммонолиз лактонов гинкго гидразином. Впервые описаны особенности реакции между различными гинкголидами и гидразином. Отсутствие стехиометрической конверсии сделало данный подход не применимым для количественного определения.

Для стандартизации таблеток по содержанию флавоноидов выбран метод ВЭЖХ-УФ с предварительным гидролизом гликозидов до агликонов. При этом рассматривались варианты внутреннего и внешнего стандарта. Для оптимизации процесса предложена система пробоподготовки с использованием в качестве внутреннего стандарта дротаверина гидрохлорид. Для рассмотренной методики провели элементы валидации методики количественного определения винпоцетина и флавоноидов гинкго.

С учетом разработанных методик и требований ГФ РФ и фармакопеи ЕАЭС относительно таблеток была составлена спецификация на готовую продукцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании литературных данных показан возрастающий интерес к комбинированным лекарственным препаратам нейропротекторной активности, в том числе на основании экстракта гинкго.

2. На основании тестов «Открытое поле», угасания рефлекса пассивного избегания и статической работоспособности были определены действующие вещества и их соотношения: экстракт листьев гинкго 64 мг и винпоцетин 10 мг.

3. С использованием математических методов планирования эксперимента определен состав таблеточной массы, обеспечивающий необходимые производственные фармацевтико-технологические показатели. Предложена технология таблетированной формы с использованием влажного гранулирования и подбором необходимых дезинтегранта, солюбилизатора и связующего вещества, обеспечивающих нормированное ГФ XV качество лекарственной формы.

4. Проведен анализ несоответствий таблетированных лекарственных форм, находящихся в гражданском обороте с 2013–2016 и 2019–2024 гг. Определены наиболее критические для фармацевтической разработки в стадии лабораторных исследований показатели качества таблеток.

5. На основании изучения физико-химических свойств и реакционной способности изучена возможность применения флуоресцентных методов стандартизации, в том числе за счет введения флуоресцентных меток. Разработаны методики стандартизации готовой формы методом ВЭЖХ-УФ с внутренним стандартом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АсТ – аспартатаминотрансфераза

АФС – активная фармацевтическая субстанция

БКС – биофармацевтическая классификационная система

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГЖХ-МС – газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ГОСТ – Государственный стандарт

г/х - гидрохлорид

ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза

ГПЦ – гидроксипропилцеллюлоза

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ИЮПАК – Международный союз теоретической и прикладной химии

ЛП – лекарственный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

НД – нормативная документация

ОФС – общая фармакопейная статья

ПВП – поливинилпирролидон

ПКЛ – поликапролактон

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РФ – Российская Федерация

СКО – среднеквадратичное отклонение

ТЛФ – твердая лекарственная форма

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТТЛ – терпеновые трилактоны

УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография

УРПИ – угасание рефлекса пассивного избегания

УФ – ультрафиолетовый (спектр, детектирование)

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

3D – трехмерный / трехмерная печать

ANOVA – analysis of variance, дисперсионный анализ

BB – Bilobalide, билобалид

C18 – октадецилсилан (неподвижная фаза для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с привитыми углеводородными цепями-C18H37)

ELSD – Evaporative Light Scattering Detector, испарительный детектор по светорассеянию

GB – Ginkgolide B, гинкголид Б

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography, высокоэффективная жидкостная хроматография

Imp – Impurity, примесь (для обозначения конкретной примеси)

LC-MS/MS – Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

L-HPC – Low-substituted Hydroxypropyl Cellulose, низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза

PEG – Polyethylene Glycol, полиэтиленгликоль

Ph. Eur– European Pharmacopoeia, Европейская фармакопея

PPAR-γ – рецепторы, активируемых пероксисомными пролифераторами типа гамма

QbD – Quality by Design, качество путем проектирования

R^2 – коэффициент детерминации

RP-HPLC – Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

RSD – Relative Standard Deviation, относительное стандартное отклонение

UHPLC-MS/MS – Ultra-High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

WO – World Intellectual Property Organization, Всемирная организация интеллектуальной собственности

ВЭЖХ-DAD-МС(ESI) – High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry (Electrospray Ionization), Высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением

Автор выражает глубочайшую признательность к. х. н. Игорю Сергеевичу Ковалеву за помощь в исследованиях реакционной способности терпеновых трилактонов, а также к. фармац. н. Сергею Анатольевичу Главатских за помощь в технологических разработках

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изучение нейротропной и антигипоксической активности композиции Гинкготропил-Форте / А. В. Крикова, С. Н. Козлов, Е. В. Конышко, А. М. Шаталова. – Текст : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 34–39.

2. **Крылов, Н. Н.** Разработка и валидационная оценка методики определения суммы флавоноидов в таблетках ноотропного действия / Н. Н. Крылов, Е. В. Компанцева. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 3. – С. 146–151.

3. Цереброваскулярные заболевания: инсульт – диагностика, лечение, профилактика / Н. А. Ковтун, Т. В. Исаева, М. И. Савельева, В. В. Бояринцев. – Текст : непосредственный // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2025. – Т. 1, № 1. – С. 80–84.

4. **Van Beek, T. A.** Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals / T. A. Van Beek, P. Montoro. – Text : unmediated // Journal of Chromatography A. – 2009. – Vol. 1216. – P. 2002–2032.

5. Пат. 2500415 C1 Российская Федерация, МПК A61K 36/16, A61K 31/475, A61P 25/28. Комбинированный лекарственный препарат. – Текст : непосредственный / Словеснова Н. В., Петров А. Ю. ; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России. – № 2011147986/15 ; заявл. 24.11.2011 ; опубл. 10.12.2013, Бюл. № 34.

6. **Froestl, W.** Cognitive enhancers (nootropics). Part 1: drugs interacting with receptors / W. Froestl, A. Muhs, A. Pfeifer. – Text : unmediated // Journal of Alzheimer’s Disease. – 2012. – Vol. 32, no. 4. – P. 793–887.

7. **Froestl, W.** Cognitive enhancers (Nootropics). Part 3: drugs interacting with targets other than receptors or enzymes. Disease-modifying drugs. Update 2014 / W. Froestl, A. Pfeifer, A. Muhs. – Text : unmediated // Journal of Alzheimer’s Disease. – 2014. – Vol. 42, no. 4. – P. 1079–1149.

8. **Крылова, И. Н.** Ноотропные средства / И. Н. Крылова. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 1, № 82. – С. 35–41.

9. Biology and chemistry of Ginkgo biloba / B. Singh, P. Kaur Gopichand, R. D. Singh, P. S. Ahuja. – Text : unmediated // Fitoterapia. – 2008. – Vol. 79, no. 6. – P. 401–418.

10. **Van Beek, T. A.** Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts / T. A. Van Beek. – Text : unmediated // Journal of Chromatography A. – 2002. – Vol. 967, no. 1. – P. 21–55.

11. Standardized extract of Ginkgo biloba enhances memory persistence over time / A. G. Soliani, B. G. Muratori, A. L. dos Santos [et al.]. – Text : unmediated // Phytomedicine Plus. – 2023. – Vol. 3, no. 2. – Art. 100441.

12. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in neurological disorders: integrating anti-inflammatory and antioxidant mechanisms / K. M. R. Bhat, L. C. Prasanna, N. K. Thonse [et al.]. – Text : unmediated // Complementary Medicine Research. – 2026. – P. 1–40.

13. **Kaur, S.** Anti-inflammatory effects of Ginkgo biloba extract against trimethyltin-induced hippocampal neuronal injury / S. Kaur, N. Sharma, B. Nehru. – Text : unmediated // Inflammopharmacology. – 2018. – Vol. 26, no. 1. – P. 87–104.

14. **Mahadevan, S.** Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses / S. Mahadevan, Y. Park. – Text : unmediated // Journal of Food Science. – 2008. – Vol. 73, no. 1. – P. R14–R19.

15. **Birks, J.** Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia / J. Birks, J. G. Evans. – Text : unmediated // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2009. – No. 1.

16. **Schulz, V.** Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: What clinical trials and guidelines fail to consider / V. Schulz. – Text : unmediated // Phytomedicine. – 2003. – Vol. 10, suppl. 4. – P. 74–79.

17. Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews / Q. Yuan, C. wen Wang, J. Shi, Z. xiu Lin. – Text : unmediated // Journal of Ethnopharmacology. – 2017. – Vol. 195. – P. 1–9.

18. Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации / Н. Н. Бойко, А. В. Бондарев, Е. Т. Жилякова [и др.]. – Текст : непосредственный // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 30–38.

19. **Щулькин, А. В.** Пероральные лекарственные формы с модифицированным высвобождением фармакологических веществ / А. В. Щулькин, Е. Н. Якушева. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 4. – С. 33–42.

20. **Бркич, Г. Э.** Технология влажного гранулирования в промышленной фармации / Г. Э. Бркич. – Текст : непосредственный // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2022. – Т. 24, № 5. – С. 24–28.

21. State of the art report on wet granulation technology / V. V. Bueva, E. V. Blynskaya, K. V. Alekseev [et al.]. – Text : unmediated // Farmacevticheskoe delo i tehnologija lekarstv (Pharmacy and Pharmaceutical Technology). – 2023. – No. 2. – C. 21–34.

22. Comprehensive review on modern techniques of granulation in pharmaceutical solid dosage forms / A. K. Vadaga, S. S. Gudla, G. S. K. Nareboina [et al.]. – Text : unmediated // Intelligent Pharmacy. – 2024. – Vol. 2, no. 5. – P. 609–629.

23. **Демина, Н. Б.** Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм / Н. Б. Демина. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – Т. 1. – С. 38–46.

24. **Чехани, Н. Р.** Разработка состава и технологии получения комплексного актопротекторного средства на основе растительного сырья / Н. Р. Чехани, Л. А. Павлова, В. М. Павлов. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. 58–68.

25. Emergence of 3D printed dosage forms: opportunities and challenges / M. A. Alhnan, T. C. Okwuosa, M. Sadia [et al.]. – Text : unmediated // Pharmaceutical Research. – 2016. – Vol. 33, no. 8. – P. 1817–1832.

26. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products / J. Norman, R. D. Madurawe, C. M. V. Moore [et al.]. – Text : unmediated // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – Vol. 108. – P. 39–50.

27. 3D Printing technologies for drug delivery: a review / L. K. Prasad, H. Smyth. – Text : unmediated // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2016. – Vol. 42, no. 7. – P. 1019–1031.

28. **Стрыгин, А. В.** Meltrex® – инновационная технология производства новой лекарственной формы препарата для антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции / А. В. Стрыгин, О. А. Козырев, Б. Е. Толкачев. – Текст : непосредственный // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2015. – Т. 11, № 2. – С. 107–111.

29. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications / V. K. Rai, N. Mishra, K. S. Yadav, N. P. Yadav. – Text : unmediated // Journal of Controlled Release. – 2018. – Vol. 270. – P. 203–225.

30. Drug forms of levothyroxine. Is there room for innovation in hypothyroidism treatment? / E. A. Kolpakova, A. A. Voznesenskaya, N. V. Frolkova, E. A. Troshina. – Text : unmediated // Clinical and Experimental Thyroidology. – 2023. – Vol. 18, no. 4. – P. 4–13.

31. Флебопротекторы на базе флавоноидов: лекарственные формы, биофармацевтическая характеристика, технологические особенности / Э. Ф. Степанова, И. П. Ремезова, А. М. Шевченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8, № 6. – С. 405–415.

32. **Демина, Н. Б.** Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы / Н. Б. Демина. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 56–60.

33. **Костыро, Я. А.** Разработка пероральной лекарственной формы гиполипидемического действия на основе сульфатированного арабиногалактана в виде калиевой соли / Я. А. Костыро, К. В. Алексеев. – Текст : непосредственный // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9, № 6. – С. 441–453.

34. Solubilization of phytocomplex using natural deep eutectic solvents: A case study of Ginkgo biloba leaves extract / Q. Dong, J. Cao, L. Chen [et al.]. – Text : electronic // Industrial Crops & Products. – 2022. – Vol. 177. – Art. 114455. – DOI : 10.1016/j.indcrop.2022.114455.

35. ОФС.1.4.1.0021 Экстракты // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – Москва, 2021. – Текст : непосредственный.

36. Перспективы создания сухих экстрактов / И. А. Самылина, О. А. Блинова, Л. А. Кумышева, С. Д. Марченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2006. – № 2. – С. 43–46.

37. **Чехани, Н. Р.** Создание комплексного актопротекторного средства на основе лекарственного растительного сырья : автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 14.04.01 / Чехани Нино Рамазовна ; Первый Моск. гос. мед. ун-т им. И. М. Сеченова. – Москва, 2015. – 26 с. – Текст : непосредственный.

38. **Павлов, В. М.** Технология получения гранулятов сухих экстрактов методом влагоактивизированной грануляции с применением клептозы в качестве вспомогательного вещества / В. М. Павлов, Н. Р. Чехани, Л. А. Павлова. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – Т. 5. – С. 762.

39. **Каухова, И. Е.** Новая методика получения растительных препаратов / И. Е. Каухова. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2006. – № 1. – С. 37–39.

40. **Хишова, О. М.** Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация (часть II) / О. М. Хишова, Н. В. Дубашинская, О. М. Шимко. – Текст : непосредственный // Вестник фармации. – 2007. – № 2 (36).

41. **Савков, И. А.** Фармацевтическая разработка состава и технологии получения лекарственных средств на основе сухого экстракта листьев малины

обыкновенной / И. А. Савков, О. М. Хишова. – Текст : непосредственный // Вестник фармации. – 2021. – Т. 4, № 94.

42. **Одуладжа, Д. О.** Разработка таблеток экстракта сабельника болотного / Д. О. Одуладжа, Д. В. Чижиков. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2007. – Т. 6. – С. 30–31.

43. **Бекежанова, Т. С.** Фармацевтическая разработка антигельминтных таблеток «Артегон» / Т. С. Бекежанова, З. Б. Сакипова, Л. Н. Ибрагимова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник фармации. – 2018. – № 1 (79).

44. **Кумышева, Л. А.** Разработка состава и технологии таблеток с растительными экстрактами / Л. А. Кумышева. – Текст : непосредственный // Образовательный вестник «Сознание». – 2007. – Т. 9, № 11.

45. Стандартизация сухого экстракта с противовоспалительными и анальгетическими свойствами из листьев Arctium tomentosum Mill. / В. В. Дудко, Т. Г. Хоружая, В. Г. Пашинский [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 3. – С. 9–13.

46. Пат. 2589507 C1 Российская Федерация. Средство на основе сухого экстракта пустырника и способ его получения / Т. Ш. Ханнанов, А. Н. Анисимов, Р. Т. Хамидуллин [и др.] ; заявитель ОАО «Татхимфармпрепараты». – № 2015109954/15A ; заявл. 20.03.2015 ; опубл. 10.07.2016. – Текст : непосредственный.

47. Разработка твердых лекарственных форм на основе сухого экстракта «Уролексан-Ф» / С. Т. Шарипова, Р. Ю. Закирова, Г. И. Мауленбергенова [и др.]. – Текст : непосредственный // Universum: технические науки. – 2022. – № 9-8 (98). – С. 5–9.

48. **Шевченко, А. М.** Разработка технологии и методов анализа таблеток с сухими экстрактами расторопши, бессмертника и биомассой гриба Fusarium sambucinum, покрытых пленочной оболочкой / А. М. Шевченко, А. Г. Науменко, Н. В. Благоразумная. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10, ч. 3. – С. 615–618.

49. **Конюхов, И. В.** Разработка таблеток гепатопротекторного действия с криоизмельченным растительным сырьем и силимарином / И. В. Конюхов, В. И. Чуешов, Д. П. Солдатов. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы медицины. – 2013. – Т. 21, № 4 (147). – С. 240–244.

50. Efficient extraction of proanthocyanidin from Ginkgo biloba leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity / J. Cao, L. Chen, M. Li [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 158. – P. 317–326.

51. Пат. 2356563. Российская Федерация МПК B01D 11/02 A61K 36/16. Способ получения экстракта гинкго билоба, экстракт, полученный этим способом, и его применение. – Текст : непосредственный / К. Эрдльмайер, Г. Хауер, Э. Кох, Ф. Ланг, К. Х. Стумпф ; патентообладатель Доктор Вильмар Швабе ГмбХ энд Ко. КГ. – № 2007143632/15 ; заявл. 24.04.2006 ; опубл. 27.05.2009. – 19 с.

52. **Karavelioglu, Z.** Preparation of chitosan nanoparticles as Ginkgo biloba extract carrier: In vitro neuroprotective effect on oxidative stress-induced human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) / Z. Karavelioglu, R. Cakir-Koc. – Text : unmediated // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 192. – P. 675–683.

53. A novel oil-body nanoemulsion formulation of Ginkgolide B: Pharmacokinetics study and in vivo pharmacodynamics evaluations / P. Yang, X. Cai, K. Zhou [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 103, no. 4. – P. 1075–1084.

54. Preparation, characterization and evaluation of Ginkgo biloba solid lipid nanoparticles / P. Haghighi, S. Ghaffari, S. A. Bidgoli [et al.]. – Text : unmediated // Nanomedicine Research Journal. – 2018. – Vol. 3, no. 2. – P. 71–78.

55. Follow that botanical: Challenges and recommendations for assessing absorption, distribution, metabolism and excretion of botanical dietary supplements / S. Waidyanatha, V. K. Ryan, A. L. Roe [et al.]. – Text : unmediated // Food and Chemical Toxicology. – 2018. – Vol. 121. – P. 194–202.

56. Highly stabilized nanocrystals delivering Ginkgolide B in protecting against the Parkinson’s disease / Y. Liu, W. Liu, X. Xiong [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 577.

57. Structure-Based Gastro-Retentive and Controlled-Release Drug Delivery with Novel 3D Printing / H. Wen, B. He, H. Wang [et al.]. – Text : unmediated // AAPS PharmSciTech. – 2019. – Vol. 20, no. 68.

58. Enhancing both oral bioavailability and anti-ischemic stroke efficacy of ginkgolide B by preparing nanocrystals self-stabilized Pickering nano-emulsion / Y. Liu, Z. Zhang, L. Cheng [et al.]. – Text : unmediated // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2024. – Vol. 192.

59. **Компанцев, Д. В.** Вспомогательные вещества для улучшения биодоступности таблетированных лекарственных форм / Д. В. Компанцев, Т. С. Гутнова. – Текст : непосредственный // Общество. – 2019. – Т. 14, no. 3. – С. 54–57.

60. Дезинтегранты и их влияние на растворение субстанций разных классов по биофармацевтической классификационной системе / И. Е. Смехова, В. А. Вайнштейн, Ю. М. Ладутько [и др.]. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – Т. 4. – С. 62–72.

61. Применение супердезинтегрантов в твердых дозированных лекарственных формах / И. В. Воскобойникова, С. Б. Авакян, Т. А. Сокольская [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2005. – Т. 2. – С. 35–37.

62. Влияние дезинтегрантов различного типа на показатели качества таблеток на основе микрокристаллической целлюлозы / Н. Б. Демина, Н. В. Бобкова, Е. А. Солодун [и др.]. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 9. – С. 32–36.

63. Применение многофакторного дисперсионного анализа и обобщённой желательности для оптимизации состава и технологии таблеток, содержащих N-бензил-N-метил-1-фенилпирроло [1, 2-а] пиразин-3-карбоксамид / С. В. Тишков, Е. В. Блынская, К. В. Алексеев [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 1. – С. 69–81.

64. Разработка технологии и исследование комбинированных таблеток с модифицированным высвобождением преднизолона и лоратадина / В. В. Давыдова, Э. Ф. Степанова, А. М. Шевченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский биотерапевтический журнал. – 2024. – Т. 2. – С. 85–91.

65. Технологические подходы к повышению биодоступности труднорастворимой субстанции кандесартана цилексетила в мини-таблетках / К. М. Церковная, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев [и др.]. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 138–149.

66. Влияние вспомогательных веществ на технологические характеристики таблетированной лекарственной формы / С. В. Трофимов, Э. Ф. Степанова, Ю. А. Обидченко. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2015. – № 5. – С. 33–35.

67. Биоэквивалентность таблетированной лекарственной формы вещества РУ-31 / А. А. Спасов, Л. А. Смирнова, А. Ф. Рябуха [и др.]. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 4. – С. 16–18.

68. Биоэквивалентность лекарственной формы нового лекарственного вещества мефебут / Л. А. Смирнова, Е. А. Сучков, А. Ф. Рябуха [и др.]. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 6. – С. 7–8.

69. Изучение кумулятивных свойств таблетированной формы нового противомигренозного средства РУ-31 / В. И. Корнилов, Д. С. Яковлев, В. В. Багметова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 17, № 4 (76). – С. 46–49.

70. Сравнительная фармакокинетика и относительная биодоступность таблетированной лекарственной формы нового анксиолитика ГМЛ-1 / А. А. Новицкий, А. А. Литвин, Р. В. Шевченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2019. – Т. 60, № 4.

71. Экспериментальное исследование комбинаций вспомогательных веществ в технологии твердой дозированной лекарственной формы 11-дезоксимизопростола / А. Г. Ялкаев, Ф. Х. Кильдияров, В. А. Катаев [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 11, № 5 (65).

72. Влияние лактозы на свойства таблетированной формы на основе яблочных выжимок / Е. И. Рябинина, Н. А. Андреева, Е. Е. Зотова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник фармации. – 2018. – № 1 (79) – С. 53–57.

73. Совершенствование технологии производства готовой лекарственной формы вакцины холерной бивалентной химической таблетированной / А. В. Комиссаров, А. Ю. Ульянов, О. А. Волох [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 94–96.

74. **Шадрин, А. А.** Совместимость субстанции рамиприла и лерканидипина в одной твердой лекарственной форме / А. А. Шадрин, Е. В. Флисюк, Е. Н. Кириллова. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 12. – С. 24–29.

75. Разработка лекарственной формы готового препарата противохолерного иммуноэнтеросорбента / М. В. Овчинникова, А. В. Комиссаров, Е. Г. Абрамова [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 100–104.

76. **Марченко, М. А.** Проблемы стандартизации в промышленном производстве лекарственных препаратов природного происхождения: критический анализ и поиск оптимальных решений / М. А. Марченко, И. Н. Зилфикаров, С. А. Постельников. – Текст : непосредственный // Биология растений и садоводство: теория, инновации. – 2018. – № 146.

77. Разработка и валидация прямых УФ-спектрофотометрических методов определения фолиевой кислоты в нерасфасованном виде и лекарственной форме / Р. О. Омер, Н. О. Абделатти, А. Е. Халид [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал прикладной спектроскопии. – 2024. – Т. 91, № 5. – С. 763–770.

78. **Цокова, Т. Н.** Метод производной УФ-спектрофотометрии определения концентрации лекарственного препарата в смесях / Т. Н. Цокова, Л. И. Котлова,

А. В. Осипова. – Текст : непосредственный // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 4-1. – С. 136–138.

79. Ginkgo biloba: An updated review on pharmacological, ethnobotanical, and phytochemical studies / M. Akaberi, H. Baharara, M. S. Amiri [et al.]. – Text : unmediated // Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine. – 2023. – Vol. 9. – Art. 100331.

80. A Narrative review of Ginkgo biloba extract: biological function, molecular mechanisms, and applications in animal production / M. Yao, L. Liu, Z. Hao [et al.]. – Text : unmediated // Antioxidants. – 2026. – Vol. 15, no. 2. – P. 251.

81. Ginkgo biloba extract: review and assessment of health benefits and potential side effects / J. Mierzwińska-Mucha, B. Roś, K. Siekaniec [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Education, Health and Sport. – 2025. – Vol. 80. – Art. 59960.

82. **Штрыголь, С. Ю.** Стандартизированный экстракт Ginkgo biloba: компоненты, механизмы действия, фармакологические эффекты, применение / С. Ю. Штрыголь, Д. В. Штрыголь. – Текст : непосредственный // Провизор. – 2005. – Т. 4. – С. 29–32.

83. **Nakanishi, K.** Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century / K. Nakanishi. – Text : unmediated // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 13, no. 17. – P. 4987–5000.

84. Inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein in vitro and in vivo: Food/herb-drug interactions and structure-activity relationships / J. Bai, S. Zhao, X. Fan [et al.]. – Text : unmediated // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2019. – Vol. 369. – P. 49–59.

85. Qualitative categorization of supplement grade Ginkgo biloba leaf extracts for authenticity / A. Chandra, Y. Li, J. Rana [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Functional Foods. – 2011. – Vol. 3, no. 2. – P. 107–114.

86. The efficacy and safety of Ginkgo terpene lactone preparations in the treatment of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials / H. Zhao, Q. Guo, B. Li, M. Shi. – Text : unmediated // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – Art. 821937.

87. Effect of origin, tree age, and harvesting time on content of flavonoids and terpene lactones in Ginkgo Folium / F. J. Shi, C. J. Yang, X. F. Chen [et al.]. – Text : unmediated // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2022. – Vol. 47, no. 15. – P. 4055–4065.

88. **Okabe, K.** Ginkgolides / K. Okabe, K. Yamada, S. Yamamura, S. Takada. – Text : unmediated // Journal of the Chemical Society C: Organic. – 1967. – no. 0. – P. 2201–2206.

89. The United States Pharmacopeia : USP 25 : The National Formulary : NF 20 / by authority of the United States Pharmacopoeial Convention, Inc. ; prepared by the Council of Experts. – Rockville, Md : United States Pharmacopeial Convention, 2002. – liv, 2675 p. – Text : unmediated.

90. Determination of ginkgolides and bilobalide in Ginkgo biloba leaves and phytopharmaceuticals / T. A. Van Beek, H. A. Scheeren, T. Rantio [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography A. – 1991. – Vol. 543, no. C. – P. 375–387.

91. The solid phase of ginkgolide K: Structure and physicochemical properties / Y. Zhang, G. Zhang, Z. Wang [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Molecular Structure. – 2016. – Vol. 1111. – P. 19–24.

92. Preparation of ginkgolide and F-seco-ginkgolide lactols: the unique reactivity of a-hydroxy lactones toward NaBH4 / K. Tanaka, K. D. Kester, N. Berova, K. Nakanishi. – Text : unmediated // Tetrahedron Letters. – 2005. – Vol. 46, no. 4. – P. 531–534.

93. Alkyl and alkoxycarbonyl derivatives of ginkgolide B: synthesis and biological evaluation of PAF inhibitory activity / L. Hu, Z. Chen, Y. Xie [et al.]. – Text : unmediated // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2000. – Vol. 8, no. 6. – P. 1515–1521.

94. Chinese Pharmacopoeia 2020 : English ed. issued in March 2023 // Cisema : сайт. – URL : https://cisema.com/news/chinese-pharmacopoeia-2020-edition-official-english-translation (дата обращения: 08.11.2024). – Текст : электронный.

95. ФС.3.4.0019.18. Гинкго двулопастного листьев экстракт сухой // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд. – Москва, 2023. – URL : femb.ru (дата обращения: 15.09.2026). – Текст : электронный.

96. Ginkgo dry extract, refined and quantified. – Text : unmediated // European Pharmacopoeia. – 7th ed., suppl. 7.1. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2011. – P. 1136–1138.

97. **Deng, F.** Development and validation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in Ginkgo biloba L. extract and pharmaceutical preparations / F. Deng, S. W. Zito. – Text : unmediated // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 986, no. 1. – P. 121–127.

98. The Contents of Terpene Trilactone and Flavonoid in Leaves of Seedlings from Ancient Female Ginkgo Trees in China / Y. Zhang, P. Liu, Q. Kong [et al.]. – Text : unmediated // Horticultural Plant Journal. – 2017. – Vol. 3, no. 4. – P. 165–171.

99. High-performance liquid chromatography method development for the quality control of Ginkgonis Semen / V. N. H. Le, W. Lee, Y. H. Kim [et al.]. – Text : unmediated // Arabian Journal of Chemistry. – 2017. – Vol. 10, no. 6. – P. 792–800.

100. Acid hydrolytic method for determination of ginkgo biloba total flavonoids in Rat plasma by HPLC for pharmacokinetic studies / J. Hu, Y. Zhao, C. Ma [et al.]. – Text : unmediated // Tsinghua Science and Technology. – 2010. – Vol. 15, no. 4. – P. 452–459.

101. Ginkgo biloba flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method / P. Sati, P. Dhyani, I. D. Bhatt, A. Pandey. – Text : unmediated // Journal of Traditional and Complementary Medicine. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 15–23.

102. An effective identification and quantification method for Ginkgo biloba flavonol glycosides with targeted evaluation of adulterated products / Y. C. Ma, A. Mani, Y. Cai [et al.]. – Text : unmediated // Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23, no. 4. – P. 377–387.

103. Adulteration of Ginkgo biloba products and a simple method to improve its detection / H. Wohlmuth, C. Savage, A. Dowell, P. Mouatt. – Text : unmediated // Phytomedicine. – 2014. – Vol. 21, no. 6. – P. 912–918.

104. Self-microemulsifying sustained-release pellet of Ginkgo biloba extract: Preparation, in vitro drug release and pharmacokinetics study in beagle dogs / Z. Gu, X. Shi, E. Omari-Siaw [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2017. – Vol. 37. – P. 184–193.

105. Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of Ginkgo biloba leaves and selected products / L. Z. Lin, P. Chen, M. Ozcan, J. M. Harnly. – Text : unmediated // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56, no. 15. – P. 6671–6679.

106. An UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of quercetin 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-rutinoside, isorhamnetin 3-O-rutinoside, bilobalide and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic study of Xingxiong injection / L. L. Dou, L. Duan, L. Guo [et al.]. – Text : unmediated // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2017. – Vol. 15, no. 9. – P. 710–720.

107. Pharmacokinetics and tissue distribution study of ginkgolide L in rats by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / J. X. Wang, X. G. Liu, Z. Y. Fan [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography B. – 2015. – Vol. 1006. – P. 30–36.

108. **Zhao, J.** Advanced strategies for quality control of Chinese medicines / J. Zhao, S. C. Ma, S. P. Li. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 147. – P. 473–478.

109. Supercritical fluid extraction and micronization of ginkgo flavonoids from ginkgo biloba leaves / S. F. Miao, J. P. Yu, Z. Du [et al.]. – Text : unmediated // Industrial and Engineering Chemistry Research. – 2010. – Vol. 49, no. 11. – P. 5461–5466.

110. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography-based method / X. Liu, S. Ahlgren, H. A. A. J. Korthout [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography A. – 2018. – Vol. 1532. – P. 198–207.

111. Direct determination of total flavones in powder of Ginkgo biloba extract by near-infrared diffuse reflection spectroscopy / G. Hu, Vol. Lü, J. Wu [et al.]. –

Text : unmediated // Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2004. – Vol. 24, no. 1. – P. 18–19.

112. **Zhang, C.** Application of near infrared spectroscopy to the analysis and fast quality assessment of traditional Chinese medicinal products / C. Zhang, J. Su. – Text : unmediated // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2014. – Vol. 4, no. 3. – P. 182–192.

113. Rapid process development of chromatographic process using direct analysis in real time mass spectrometry as a process analytical technology tool / B. Yan, T. Chen, Z. Xu, H. Qu. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2014. – Vol. 94. – P. 106–110.

114. Quality control evaluation of nutraceutical products from Ginkgo biloba using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry / N. López-Gutiérrez, R. Romero-González, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2016. – Vol. 121. – P. 151–160.

115. LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 11 compounds of Ginkgo biloba extract in lysates of mesangial cell cultured by high glucose / J. Y. Qiu, X. Chen, Z. Li [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography B. – 2015. – Vol. 997. – P. 122–128.

116. Comprehensive analysis of chemical constituents in Xingxiong injection by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry / L. Guo, L. L. Dou, L. Duan [et al.]. – Text : unmediated // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2015. – Vol. 13, no. 9. – P. 711–720.

117. **Kaur, P.** Optimization of extraction technique and validation of developed RP-HPLC-ELSD method for determination of terpene trilactones in Ginkgo biloba leaves / P. Kaur, A. Chaudhary, B. Singh Gopichand. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2009. – Vol. 50, no. 5. – P. 1060–1064.

118. Synthesis and evaluation of 2′-hydroxyethyl trans-apovincaminate derivatives as antioxidant and cognitive enhancer agents / A. Nemes, L. Czibula, C. Szántay [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 51, no. 3. – P. 479–486.

119. Synthesis of vinca alkaloids and related compounds-XVI. New route to the stereoselective synthesis of (+)-vincamine, (-)-vincamone and (+)-apovincaminic acid esters / L. Szabó, J. Sápi, G. Kalaus [et al.]. – Text : unmediated // Tetrahedron. – 1983. – Vol. 39, no. 22. – P. 3737–3747.

120. Development and validation of an RP-HPLC method for the determination of vinpocetine and folic acid in the presence of a vinpocetine alkaline degradation product in bulk and in capsule form / E. F. Elkady, M. H. Tammam, A. A. Mohamed. – Text : unmediated // Journal of AOAC International. – 2017. – Vol. 100, no. 3. – P. 671–676.

121. Лекарственные средства нового фармакологического класса – антигипоксанты (актопротекторы) (фармакологические эффекты, результаты и перспективы применения в общемедицинской практике, военной медицине и медицине экстремальных состояний) / А. Н. Лызиков, А. Э. Питкевич. – Гомель : ГомГМУ, 2007. – 132 с. – Текст : непосредственный

122. Determination of vinpocetine and its primary metabolite, apovincaminic acid, in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / H. M. Xia, L. N. Su, J. W. Guo [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography B. – 2010. – Vol. 878, no. 22. – P. 1959–1966.

123. **El-Laithy, H. M.** Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: Preclinical and clinical studies / H. M. El-Laithy, O. Shoukry, L. G. Mahran. – Text : unmediated // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2011. – Vol. 77, no. 1. – P. 43–55.

124. Improved gas chromatographic–mass spectrometric method for the quantitative determination of vinpocetine in human plasma / M. Vatsova, S. Tzvetanov, A. Drenska [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1997. – Vol. 702, no. 1–2. – P. 221–226.

125. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с. – Текст : непосредственный.

126. **Lichtblau, D.** Efficient extraction of ginkgolides and bilobalide from Ginkgo biloba leaves / D. Lichtblau, J. M. Berger, V. Nakanishi. – Text : unmediated // Journal of Natural Products. – 2002. – Vol. 65, no. 10. – P. 1501–1504.

127. **Kumar, Y.** Evaluation of alpha glucosidase inhibitor (miglitol) for its efficacy in constipation associated with diabetes / Y. Kumar, A. Thakur, R. K. Goyal. – Text : unmediated // Indian journal of pharmaceutical education and research. – 2019. – Vol. 53, no. 3. – P. S387–S391.

128. **Mohamed Kamel, G. A.** Vinpocetine attenuates fluoxetine-induced liver damage in rats; Role of Nrf2 and PPAR-γ / G. A. Mohamed Kamel, M. T. Abdel-Aziz, A. A. Shaker. – Text : unmediated // Human & Experimental Toxicology. – 2021. – Vol. 40, no. 12. – Suppl. – P. S509–S518.

129. **Cai, Y.** Vinpocetine attenuates lipid accumulation and atherosclerosis formation / Y. Cai, J. D. Li, C. Yan. – Text : unmediated // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2013. – Vol. 434, no. 3. – P. 439–443.

130. A material sparing method for quantitatively measuring tablet sticking / T. S. McDermott, J. Farrenkopf, A. Hlinak [et al.]. – Text : unmediated // Powder Technology. – 2011. – Vol. 212, no. 1. – P. 240–252.

131. Mechanism and Kinetics of Punch Sticking of Pharmaceuticals / S. Paul, L. J. Taylor, B. Murphy [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2017. – Vol. 106, no. 1. – P. 151–158.

132. **Гайченко А.** От влажного гранулирования к прямому прессованию / А. Гайченко. – Текст : непосредственный // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2014. – № 246. – С. 36–41.

133. Effect of certain tablet formulation factors on dissolution rate of the active ingredient I11 / G. Levy, R. H. Gumtow. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1963. – Vol. 52, no. 12. – P. 1139–1144.

134. Disintegration test of health food products containing Ginkgo biloba L. or Vitex agnus-castus L. in the Japanese market / N. Sato-Masumoto, S. Masada, S. Takahashi [et al.]. – Text : unmediated // Medicines. – 2015. – Vol. 2, no. 2. – P. 47–54.

135. Synthesis and pharmacological evaluation of (nitrooxy) alkyl apovincaminate / Y. Kawashima, T. Ikemoto, A. Horiguchi [et al.]. – Text : unmediated // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2003. – Vol. 51, no. 10. – P. 1195–1200.

136. Improving biopharmaceutical properties of vinpocetine through cocrystallization / S. Golob, M. Perry, M. Lusi [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 105, no. 12. – P. 3626–3633.

137. Colour-tuneable solid-state fluorescence of crystalline powders formed from push–pull substituted 2,5-diphenyl-stilbenes / K. Pauk, S. Luňák, A. Růžička [et al.]. – Text : unmediated // RSC Advances. – 2022. – Vol. 12, no. 54. – P. 34797–34807.

138. ОФС.1.4.2.0013.15 Распадаемость таблеток и капсул // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIII изд. – Москва, 2016. – URL : regmed.ru (дата обращения: 09.05.2026). – Текст : электронный.

139. Актуальные вопросы оценки качества препаратов в лекарственной форме «таблетки» / Е. Л. Ковалева, О. А. Матвеева, Е. Е. Колганова, М. М. Миронова. – Текст : непосредственный // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – № 3. – С. 39–43.

140. Quality by design (QbD): an emerging trend in improving quality and development of pharmaceuticals / M. S. M. Mohurle, M. D. A. J. Asnani, D. D. R. Chaple [et al.]. – Text : unmediated // Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 05, no. 12. – P. 1132–1138.

141. **Markl, D.** A review of disintegration mechanisms and measurement techniques / D. Markl, J. A. Zeitler. – Text : unmediated // Pharmaceutical Research. – 2017. – Vol. 34, no. 5. – P. 890–917.

142. Pat. 101972234 China IPC A61K 31/165 A61K 9/20. Preparation method of ginkgo biloba extract dispersible tablet. – Text : unmediated / S. Wenmin ; patentee Xiangbei Welman Pharmaceutical Co Ltd. – № 201010505225.4 ; filed 13.10.2010 ; publ. 16.02.2011. – 12 p.

143. **Strachan, C. E.** The formulation technology of dispersible tablets: PhD thesis / C. E. Strachan; University of Otago. – Dunedin, 2005. – 180 p. – Text : unmediated.

144. Вспомогательные вещества в технологии таблеток, диспергируемых в полости рта / А. И. Кузнецова, М. В. Карлина, В. М. Косман [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник фармации. – 2025. – № 1 (107). – С. 43–57.

145. Pat. 5951925 United States IPC A61K 9/20 A61K 47/38. Low-substituted hydroxypropyl cellulose and process for producing same. – Text : unmediated / S. Obara, F. Tanno ; patentee Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. – No. 09/307736 ; filed 11.05.1999 ; publ. 14.09.1999. – 14 p.

146. Evaluation of low-substituted hydroxypropylcelluloses (L-HPCs) as filler-binders for direct compression / C. Alvarez-Lorenzo, J. L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutics. – 2000. – Vol. 197, no. 1–2. – P. 107–116.

147. Formulation and evaluation fast disintegrating tablet: A Comprehensive Review / H. Gosavi, D. A. Maru, J. Bhadane, N. Pawar. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2025. – Vol. 03, no. 05. – P. 2257–2269.

148. **El-Setouhy, D. A.** Bioenhanced sublingual tablet of drug with limited permeability using novel surfactant binder and microencapsulated polysorbate: In vitro/in vivo evaluation / D. A. El-Setouhy, E. B. Basalious, N. S. Abdelmalak. – Text : unmediated // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2015. – Vol. 94. – P. 386–392.

149. Effects of tween-80 on the dissolution properties of daidzein solid dispersion in vitro / L. Hu, N. Zhang, G. Yang, J. Zhang. – Text : unmediated // International Journal of Chemistry. – 2011. – Vol. 3, no. 1. – P. 44–51.

150. **Огнещикова, Н. Д.** Стандартизация и сравнительный анализ качества таблеток ацетилсалициловой кислоты / Н. Д. Огнещикова, Т. В. Орлова, А. В. Нестерова. – Текст : непосредственный // Человек и его здоровье. – 2023. – Т. 26, no. 4. – С. 93–98.

151. Dissolution test of herbal medicines containing Passiflora sp / A. R. T. Costa, S. F. Alves, E. C. da Conceição [et al.]. – Text : unmediated // Revista Brasileira de Farmacognosia. – 2011. – Vol. 21, no. 3. – P. 525–531.

152. Vinpocetine (a comprehensive profile) / N. Y. Khalil, A. H. Bakheit, H. M. Alkahtani, T. al-Muhanna. – Text : unmediated // Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. – 2022. – Vol. 47. – P. 1–54.

153. Pat. 2017004122 WIPO IPC A61K 9/20 A61K 47/38. Immediate-release tablets containing a drug and processes for forming the tablets. – Text : unmediated / S. Kothari, P. Mantik, A. Mauerer, H. Rezai; patentee Genentech, Inc. – No. PCT/US2016/039960; filed 28.06.2016; publ. 05.01.2017. – 48 p.

154. **Shotton, E.** Effect of intragranular and extragranular disintegrating agents on particle size of disintegrated tablets / E. Shotton, G. S. Leonard. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1976. – Vol. 65, no. 8. – P. 1170–1174.

155. Safety data sheet for avicel PH microcrystalline cellulose (grade PH-101) / FMC BioPolymer. – Rev. ed. – Philadelphia: FMC BioPolymer, 2015. – 6 p. – Text : unmediated

156. Pat. 9089493 United States IPC A61K 8/29 A61Q 19/00. Directly compressible composition comprising microcrystalline cellulose. – Text : unmediated / H. Shah, K. Shah; patentee Signet Chemical Corporation Pvt. Ltd. – No. 14/419816 ; filed 19.12.2014 ; publ. 28.07.2015. – 26 p.

157. **Ахмед, А.** Разработка состава и технологии таблеток целекоксиба немедленного и контролируемого высвобождения : автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 3.4.1 / А. Ахмед ; Первый Моск. гос. мед. ун-т им. И. М. Сеченова. – Москва, 2023. – 20 с. – Текст : непосредственный.

158. Государственный реестр лекарственных средств // Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения : сайт. – URL : roszdravnadzor.gov.ru (дата обращения: 07.01.2026). – Текст : электронный.

159. **Олейникова, Т. А.** Структура причин изъятия из обращения лекарственных средств ненадлежащего качества / Т. А. Олейникова. – Текст : непосредственный // Региональный вестник. – 2020. – Т. 16. – С. 60–62.

160. **Крупинина, С. И.** Анализ некачественных лекарственных средств на фармацевтическом рынке / С. И. Крупинина. – Текст : непосредственный // Научные труды : сборник статей. – 2021. – С. 350–354.

161. Риск-ориентированный подход оптимизации процесса фармацевтической разработки лекарственных препаратов / А. Е. Федорова, А. В. Федоров, Н. Б. Романова, В. В. Лазарев. – Текст : непосредственный // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2022. – Т. 24, № 4. – С. 38–43.

162. **Камаева, С. С.** Риск-ориентированный подход при анализе качества таблеток кислоты ацетилсалициловой / С. С. Камаева, Г. Ю. Меркурьева, Н. Н. Умарова. – Текст : непосредственный // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. – 2023. – № 3. – С. 112–119.

163. **Matveeva, O. A.** Assessment and control of organic impurities in medicinal products: a review / O. A. Matveeva, E. L. Kovaleva, A. A. Ponomarenko. – Text : unmediated // Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation. – 2024. – Vol. 14, no. 2. – P. 217–227.

164. **Кирюшкина, Е. В.** Методика отзыва недоброкачественной продукции с фармацевтического рынка / Е. В. Кирюшкина, И. А. Кострикина. – Текст : непосредственный // Измерение. Мониторинг. Управление. Контроль. – 2023. – Т. 2, № 44. – С. 54–61.

165. Standard Reference Material 936a: Quinine sulfate dihydrate // National Institute of Standards and Technology (NIST) : site. – URL : nist.gov (дата обращения: 13.08.2026). – Text : electronic.

166. Возможности флуоресцентного (спектрального) экспресс-анализа твердых лекарственных форм / Ю. Г. Зюзькова, В. Е. Прокопьев, В. В. Удут [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 88–94.

167. **Кушнир, А. А.** Определение ноотропов в лекарственных средствах, биологических объектах и пищевых добавках (обзор) / А. А. Кушнир, П. Т. Суханов, К. О. Сизо. – Текст : непосредственный // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 1. – С. 5–19.

168. **Амелин, В. Г.** Неразрушающий контроль лекарственных средств цветометрическим методом с использованием смартфона и приложения PhotoMetrix PRO® / В. Г. Амелин, О. Э. Емельянов. – Текст : непосредственный // Журнал аналитической химии. – 2022. – Т. 77, № 3. – С. 244–251.

169. Spectrofluorometric Determination of Drotaverine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations / D. R. El-Wasseef, D. El-Sherbiny, M. Eid, F. Belal. – Text : unmediated // Analytical Letters. – 2008. – Vol. 41, no. 13. – P. 2354–2362.

170. An efficient etherification of Ginkgo biloba extracts with fewer side effects in a micro-flow system / Y. Qin, W. He, M. Su [et al.]. – Text : unmediated // Chinese Chemical Letters. – 2016. – Vol. 27, no. 10. – P. 1644–1648.

171. Synthesis, in silico and in vivo blood brain barrier permeability of ginkgolide B cinnamate / Y. M. Lu, J. Pan, W. N. Zhang [et al.]. – Text : unmediated // Fitoterapia. – 2015. – Vol. 106. – P. 110–114.

172. Continuous synthesis of ginkgolide B derivatives in a micro-flow system / Y. Qin, W. He, M. Su [et al.]. – Text : unmediated // Tetrahedron Letters. – 2016. – Vol. 57, no. 11. – P. 1243–1246.

173. **Бурлака, С. Д.** Реакции присоединения аминов по активированной двойной связи фуранонов / С. Д. Бурлака, Г. Ф. Музыченко. – Текст : непосредственный // Научные труды КубГТУ. – 2018. – Т. 8. – С. 194–199.

174. **Cheremushkin, A. I.** Carboxymethylalginic acid ethyl ester and its reactions with N-nucleophiles / A. I. Cheremushkin, T. I. Taradeiko, A. A. Iosep. – Text : unmediated // Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – Vol. 85, no. 6. – P. 1477–1481.

175. **Sumi, K.** Synthesis of a highly luminescent three-dimensional pyrene dye based on the spirobifluorene skeleton / K. Sumi, G. I. Konishi. – Text : unmediated // Molecules. – 2010. – Vol. 15. – P. 7582–7592.

176. **Valeur, B.** Molecular fluorescence: principles and applications / B. Valeur, M. N. Berberan-Santos. – 2nd ed. – Weinheim : Wiley-VCH, 2012. – 588 p. – Text : unmediated

177. **Сафронов, И. В.** Реагенты для модификации белково-нуклеиновых комплексов. III. Сайт-специфическая фотомодификация элонгирующего транскрипционного комплекса Т7 РНК-полимеразы / И. В. Сафронов, И. О. Драчкова, И. О. Петрусева // Биоорганическая химия. – 2001. – Т. 27, no. 5. – С. 372–382.

178. **Mitchell, R. H.** N-bromosuccinimide-dimethylformamide: a mild, selective nuclear monobromination reagent for reactive aromatic compounds / R. H. Mitchell, Y. H. Lai, R. V. Williams. – Text : unmediated // Journal of Organic Chemistry. – 1979. – Vol. 44, no. 25. – P. 4733–4735.

179. Synthesis of oligonucleotide adducts of the bay region diol epoxide metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons / H. Lee, E. Luna, M. Hinz [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Organic Chemistry. – 1995. – Vol. 60, no. 17. – P. 5604–5613.

180. Intramolecular and intermolecular hydroxyl reactivity differences in ginkgolides A, B and C and their chemical applications / E. J. Corey, K. S. Rao, A. K. Ghosh. – Text : unmediated // Tetrahedron Letters. – 1992. – Vol. 33, no. 46. – P. 6955–6958.

181. Chandrakant Bhadane, C. Stability indicating RP-HPLC method development and validation for vinpocetine in bulk drug and pharmaceutical dosage form / C. Chandrakant Bhadane, S. P. Pawar, M. Amitkumar [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of All Research Education and Scientific Methods (IJARESM). – 2024. – Vol. 12, no. 6. – P. 2455–6211.

182. **Karaer, Ö.** Development of a validated stability-indicating hplc method for vinpocetine in the presence of potential impurities in tablet dosage form by

multiresponse optimization / Ö. Karaer, Ş. Dinç-Zor, B. Aşçı. – Text : unmediated // Journal of AOAC International. – 2022. – Vol. 105, no. 3. – P. 688–695.

183. Выделение, идентификация и количественное определение флавоноидов из цветков клекачки перистой / А. Ю. Соколова, А. М. Полуянов, А. И. Бардаков [и др.]. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 155–163.

184. Стандартизация действующих веществ валерианы лекарственной в растительном сырье и таблетках экстракта валерианы / Н. П. Антонова, Е. П. Шефер, С. С. Прохватилова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 2. – С. 49–54.

185. **Ковалева, Е. Л.** Совершенствование подходов к оценке однородности дозирования в Государственной Фармакопее РФ / Е. Л. Ковалева, Д. Б. Ковалев. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 10. – С. 46–52.

186. **Martins, J. M.** Uniformity of dosage units – comparative study of methods and specifications between Eur. Pharm. 3rd and USP 23 / J. M. Martins, A. Farinha. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1998. – Vol. 18, no. 4–5. – P. 487–495.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Синтез флуоресцентных реагентов

1- бромпирен (PyrBr) синтезирован по известной методике.

Пирен-1-карбальдегид (PyrCHO). Высушенный 1-бромпирен (500 мг, 1,78 ммоля) растворили в сухом ТГФ (20 мл). Полученный раствор поместили в колбу Шленка и охладили до –78 °С в атмосфере аргона. Добавили раствор BuLi в гексане (2.5 моль • л – 1, 0.75 мл), полученную смесь перемешивали при –78 °С в течение 5 мин и добавили сухой ДМФА (0.15 мл, 1.96 ммоля). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. (Магнитная мешалка IKA RCT basic). После этого добавили воду (30 мл) и продукт экстрагировали этилацетатом (3×15 мл). Экстракт высушили безводным сульфатом натрия. Растворители отогнали при пониженном давлении (ротационный испаритель IKA RV 3, Германия). Продукт очищали перекристаллизацией (толуол). Выход 250 мг (61%), т. пл. 124–126 °С. Спектр ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$, δ, м.д.): 8.12 (д, 1 H, J = 8.0 Гц); 8.22–8.41 (м, 6 H); 8.47 (д, 1 H, J = 8.0 Гц); 9.45 (д, 1 H, H(2), J = 9.2 Гц); 10.81 (с, 1 H, CHO). Масс-спектр (APCI), m/z (%): 231.08 $[M+H]^+$ (100**)**

Пирен-1-карбоновая кислота (PyrCOOH). Сухой 1-бромпирен (500 мг, 1.78 ммоля) растворили в сухом ТГФ (20 мл). Раствор поместили в колбу Шленка и охладили до –78 °С в атмосфере аргона. Далее добавили раствор BuLi в гексане (2,5 моль • л – 1, 0,75 мл) и полученную смесь перемешивали 5 мин при –78 °С. Затем добавили этилхлорформиат (0,18 мл; 1,87 ммоля) и смесь перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Далее реакционную массу промыли водным раствором NH_4Cl. Промежуточный этиловый эфир 3 экстрагировали этилацетатом (3×15 мл). Экстракт высушили безводным сульфатом натрия. Растворители отогнали при пониженном давлении. К остатку добавили раствор KOH (1,5 г; 26,7 ммоля) в воде (3 мл) и полученную смесь перемешивали при кипячении в течение 10 минут, порционно добавляя воду до тех пор, пока очередная порция не начнет вызывать появление опалесценции. Растворители отогнали при пониженном давлении. К остатку добавили воду (100 мл), а затем соляную

кислоту (10 %) до pH = 3. Образовавшийся осадок отфильтровали, промыли водой, высушили. Выход 350 мг (81 %), т. пл. > 250 °C. Найдено (%): C, 82.84; H, 4.01; $C_{17}H_{10}O_2$. Вычислено (%): C, 82.91; H, 4.09. Спектр ЯМР ^{1}H (DMSO-d6, δ, м. д., J/Гц): 8.09 (д. д, 1 H, H(7), J = 7.6, J = 7.6); 8.17 (д, 1 H, J = 8.8); 8.20–8.42 (м, 5 H); 8.64 (д, 1 H, J = 8.0); 9.31 (д, 1 H, H(2), J = 9.2); 13.03 (уш. с, 1 H, COOH). Масс-спектр (ESI), m/z (%): 245.06 $[M–H]^–$ (100).

Оксим пирен 1 карбальдегида (14). Пирен-1-карбальдегид (250 мг, 1.09 ммоля) растворили в этаноле (60 мл). Добавили раствор гидрохлорида гидроксиламина (360 мг, 5.45 ммоля) и ацетата натрия (450 мг, 5.48 ммоля) в воде (5 мл). Полученную смесь перемешивали при 55 °C в атмосфере аргона в течение 5 часов. Этанол упарили при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (силика гель, элюент – хлороформ, R_f = 0.7). Выход 180 мг (67 %), т. пл. 191–193 °C. Найдено (%): C, 83.06; H, 4.44; N, 5.53. $C_{17}H_{11}NO$. Вычислено (%): C, 83.25; H, 4.52; N 5.71. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ, м. д., J/Гц): 7.78 (с, 1 H, OH); 8.00–8.08 (м, 2 H); 8.11 (д, 1 H, J = 8.8), 8.16 (м, 2 H); 8.22 (м, 2 H); 8.37 (д, 1 H, J = 7.9); 8.58 (д, 1 H, H(2), H(2), J = 9.2); 9.14 (с, 1 H, ArCH = NOH). Масс-спектр (ESI), m/z (%): 246.09 $[M+H]^+$ (100).

Аминометилпирена гидроацетат NPyr • AcOH. Оксим пирен-1-карбальдегида (1 г, 4.08 ммоля) растворили в ледяной уксусной кислоте (30 мл). Добавили цинковую пыль (3.8 г) и полученную смесь перемешивали 15 ч при комнатной температуре. Раствор профильтровали (вакуумный мембранный насос IKA MVP 10 basic, Германия), к фильтрату добавили водный раствор аммиака до pH = 9. Образовавшийся осадок отфильтровали и высушили в вакууме. Выход 40 %, т. пл. > 250 °C. Найдено (%): C, 78.15; H, 4.89; N, 4.52. $C_{17}H_{14}N$ • ($CH_3COO^–$). Вычислено (%): C, 78.33; H, 5.08; N, 4.81. Спектр ЯМР ^{1}H (DMSO-d6, δ, м. д.): 1.86 (с, 3 H, Ac); 4.51 (с, 2 H, CH_2); 7.97–8.22 (м, 8 H); 8.39 (д, 1 H, H(2), J = 9.2 Гц). Масс-спектр (ESI), m/z (%): 215.08 $(M+H–NH_3)^+$ (100).

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Изменение показателей теста «открытое поле» относительно исходного, проценты

Вещество	**до введения**				**вещество без гинкго**				**смесь «вещество – гинкго»**			
Период наблюдения	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**
Период нахождения на центральном круге												
Магния оксид	62,9	114,4	82,1	316,9	155,0	57,5	56,0	98,5	72,3	92,9	83,9	69,9
Токоферол	50,1	51,3	367,4	198,9	66,2	18,7	77,3	178,6	43,2	302,2	108,2	88,0
Тиамин	93,1	52,9	366,3	268,5	124,8	35,0	22,5 *	33,9	170,6	185,3	131,8#	44,0
Пиридоксин	79,5	115,6	132,0	84,1	15,4	23,3	9,1 *	8,4 *	106,2	54,8	44,2#	68,9”#
Рибофлавин	50,3	99,4	235,9	192,0	130,5”	52,4	270,1	125,3	90,7	70,7	76,7	774,7
Глицин	130,0	97,0	173,0	230,0	106,9	264,0	95,2	208,6	63,3	90,0	285,0	1850,0
B_{12}	71,0	155,2	97,6	123,6	184,4	177,1	114,6	135,4	237,5	100,0	258,3	154,2
Контроль	98,0	159,8	310,3	245,1	89,3	86,2	198,7	149,6	172,0	41,4	134,3	78,6#
Горизонтальная двигательная активность												
Магния оксид	73,5	173,6	49,5	79,3	170,0	134,5	276,2	206,4	91,3	110,0	117,7	113,7
Токоферол	67,5	23,0	29,4	33,9	244,4	277,8”	142,8”	174,4	73,5	96,2 #	126,3	97,7
Тиамин	108,6	50,4	366,3	52,0	251,6	114,3	22,5	67,7	250,3	174,0”	131,8	281,8”#
Пиридоксин	79,5	54,3	47,5	42,2	15,4	78,9	65,0	144,4”	106,2#	151,5	228,2	144,7
Рибофлавин	53,6	37,7	45,0	34,9	90,3	70,7	181,1”	216,6	113,4	186,4”	79,1	56,0
Глицин	126,7	150,0	56,3	139,3	69,2	72,6	49,7	125,3	90,2	66,9	114,1	150,8
B_{12}	72,5	37,8	17,9	31,3	65,9	139,0	77,8	115,0	174,2	524,7	203,3	169,7
Контроль	32,8	12,5	16,0	19,0	57,9	94,5	110,5	112,1	57,7	146,9	60,3	200,6

Продолжение приложения Б

Вещество	**до введения**				**вещество без гинкго**				**смесь «вещество – гинкго»**			
Период наблюдения	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**150 мин**
Исследовательская активность												
Магния оксид	60,3	90,7	31,3	105,3	10,0	65,0	65,0	10,0	80,0	40,0	40,0	60,0
Токоферол	88,5	35,8	45,3	33,5	110,0	160,0	220,0	130,0	33,3	73,3	106,7	80,0
Тиамин	107,7	58,7	85,7	77,4	180,0	82,2	34,4	98,9	93,3	80,0	43,3	60,0
Пиридоксин	104,2	30,6	41,7	18,1	19,4	44,4	44,4	69,4	133,3	66,7	100,0	50,0
Рибофлавин	136,8	57,9	49,5	56,6	48,0	24,0	112,0	18,0”	130,0	176,7	38,3	3,3”
Глицин	68,8	83,2	52,0	117,9	41,7”	63,3	23,3	93,3	55,0	75,0	290,0 #	245,0
B_{12}	62,5	75,0	16,7	33,3	35,4	50,0	47,9	68,8	62,5	250,0	43,8	56,3
Контроль	66,7	36,7	70,0	70,0	20,0	80,0	180,0	180,0	30,0	30,0	20,0	20,0
Вертикальная двигательная активность												
Магния оксид	80,0	106,7	41,3	106,7	40,0	20,0	0,0	80,0	60,0	0,0	0,0	0,0
Токоферол	81,7	31,7	31,7	70,0	110,0 *	60,0	150,0	50,0	80,0	20,0	120,0	60,0
Тиамин	110,0	45,0	60,3	160,0	120,0	80,0	33,3	0,0	100,0	0,0	66,7	160,0
Пиридоксин	176,2	143,7	60,3	57,9	33,3	50,0	33,3	133,3*	133,3	66,7	66,7	33,3
Рибофлавин	70,9	26,7	32,4	28,4	20,0	20,0	80,0	80,0	160,0	80,0	60,0	60,0
Глицин	138,9	208,4	77,5	106,9	60,0 *	40,0	40,0	180,0	60,0	60,0	60,0	140,0
B_{12}	50,3	45,8	15,3	16,4	25,0	145,8*	100,0*	25,0	16,7	208,3	350,0	166,7
Контроль	80,0	20,0	20,0	60,0	0,0	20,0	0,0	0,0	20,0	20,0	0,0	0,0

П р и м е ч а н и е . * – Достоверно относительно контрольной группы по критерию Манна – Уитни ($p < 0,05$, $n = 10$); ” – достоверно относительно показателей до введения по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$, $n = 10$); # – достоверно относительно эффекта после введения вещества без гинкго по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$, $n = 10$).

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Титульный лист патента на изобретение № RU 2500415 C2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 500 415** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 36/16 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011147986/15, 24.11.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.11.2011

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **24.11.2011**

(43) Дата публикации заявки: **27.05.2013** Бюл. № 15

(45) Опубликовано: **10.12.2013** Бюл. № **34**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Ошбыш Т.Е. Исследование целесообразности совместного применения нейропротекторов с экстрактом Гинкго Билоба: Автореф. дисс. на соиск. учен. степени кандидата фармацевтических наук, Пятигорск, 2006. DE 102007030495 A1, 15.01.2009. WO 2008080333 A1, 10.07.2008. RU 2321408 C1, 10.04.2008.**

Адрес для переписки:
620028, г.Екатеринбург, ул. Репина, 3, ГБОУ ВПО УГМА, Проректору О.П. Ковтун

(72) Автор(ы):
Словеснова Наталья Валерьевна (RU),
Петров Александр Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Уральская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации" (ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России) (RU)

RU 2500415 C2

(54) КОМБИНИРОВАННЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к пероральному лекарственному средству, обладающему антигипоксическим, ноотропным и гиполипидемическим действием. Пероральное лекарственное средство, обладающее антигипоксическим, ноотропным и гиполипидемическим действием, содержит комбинацию винпоцетина и экстракта листьев гинкго в соотношении 1:(3,5-16). Вышеописанное лекарственное средство обладает выраженным антигипоксическим, ноотропным и гиполипидемическим действием. 1 з.п. ф-лы, 6 табл.

RU 2500415 C2

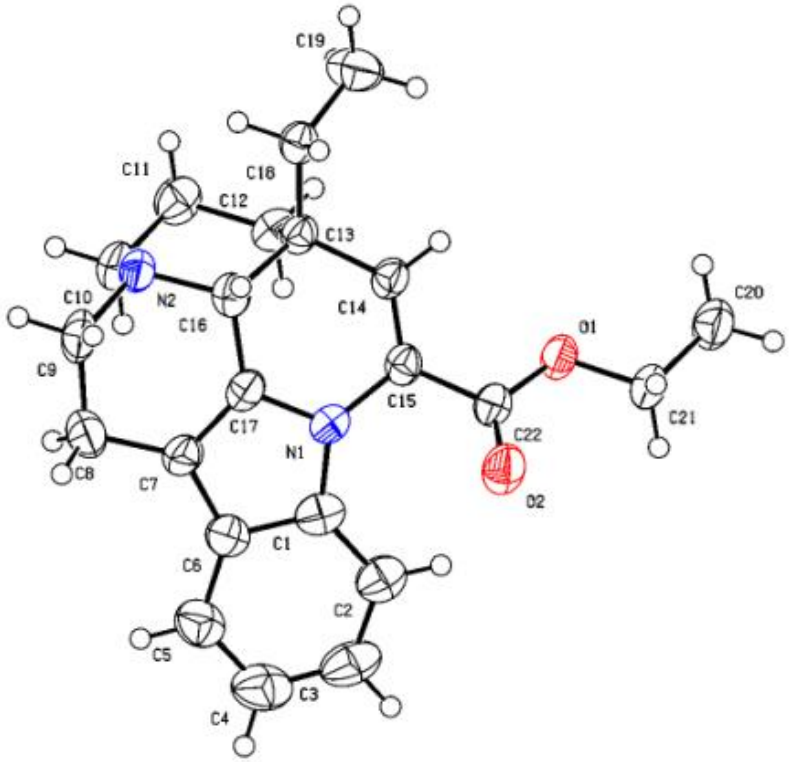
ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Сравнение растворимости действующих ингредиентов в различных растворителях

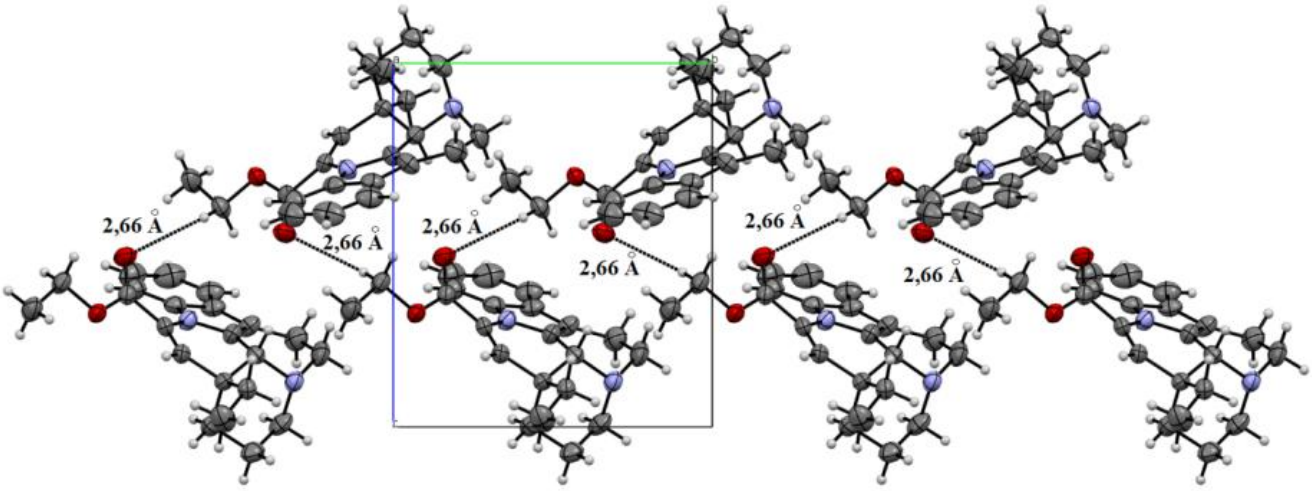
Вещество и/или группа веществ	**Растворимость в воде**	**Растворимость в спиртах (этанол/метанол)**	**Растворимость в органических растворителях (хлороформ, ацетон и др.)**
Терпеновые трилактоны *(гинкголиды, билобалид)*	Малорастворимы (около 0,1 мг/мл), но имеют самую высокую полярность в этой группе	Хорошо растворимы	Хорошо растворимы в ацетоне, этилацетате, диоксане
Флавоноиды *(в форме гликозидов)*	Умеренно/малорастворимы (зависит от числа остатков сахаров)	Хорошо растворимы	Практически нерастворимы в хлороформе и диэтиловом эфире
Флавоноиды *(в форме агликонов)*	Практически нерастворимы	Хорошо растворимы	Растворимы в этилацетате, ацетоне, диэтиловом эфире
Винпоцетин *(синтетический алкалоид)*	Практически нерастворимы (гидрофобная молекула, <0,001 мг/мл)	Малорастворим в холодном этаноле	Легко растворим в хлороформе и метиленхлориде

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Результаты рентгеноструктурного анализа



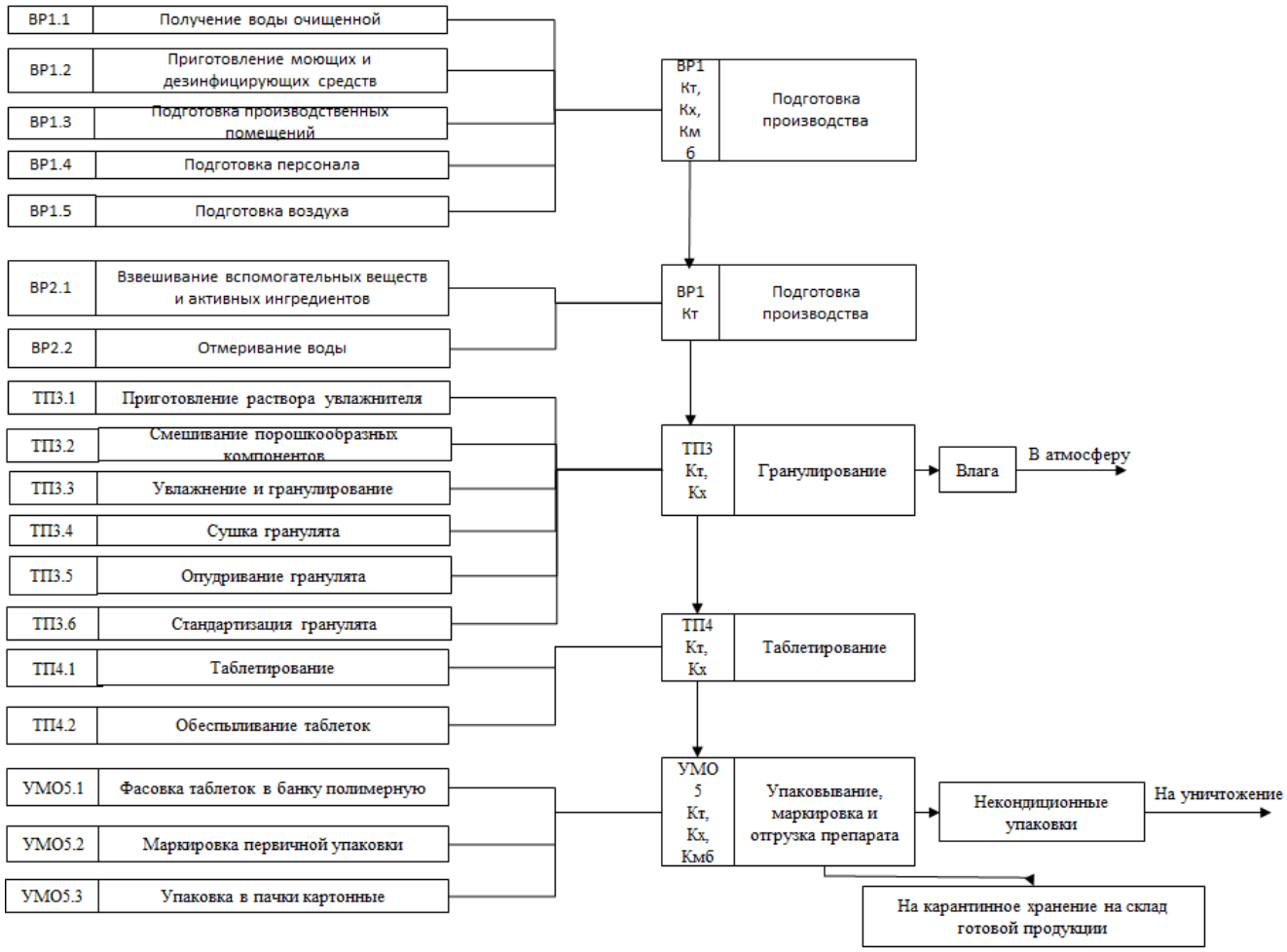
Данные РСА винпоцетина в тепловых эллипсоидах 50 % вероятности и принятая в структурном эксперименте нумерация атомов



Упаковка молекул винпоцетина в кристалле (показана проекция вдоль оси a).

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Технологическая схема производства таблеток винпоцетин с гинкго 10 + 64 мг



ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Титульный лист лабораторного регламента на производство таблеток композитного препарата «Экстракт гинкго и винпоцетин» 64+10 мг

МИНЕСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Конфиденциальность гарантируется
Получателем информации

Утверждаю:

Проректор по научно-исследовательской
и инновационной деятельности
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России,
д.м.н., проф.
_____ Мелкозерова О.А.
«29» апреля 2026г

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

На производство таблеток
композитного препарата «Экстракт гинкго и винпоцетин» 64+10 мг

Срок действия документа до «__» _____20__г

Екатеринбург, 2026

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебный процесс

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России)
ул. Репина, 3, г.Екатеринбург, 620028
Тел. (343) 214-86-73
E-mail: urist@usma.ru
ИНН/КПП 6658017389/665801001

«Утверждаю»
Проректор по образовательной деятельности ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
К.м.н., доцент
_____ Ушаков А.А
«26» мая 2026 г.

АКТ
внедрения в учебный процесс кафедры фармации

результатов диссертационного исследования Словесновой Натальи Валерьевны на тему: «Комплексная фармацевтическая разработка композитной твердой лекарственной формы на основе гинкго двулопастного»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя – и.о. заведующего кафедрой фармации Петрова А.Л. и членов – д.фарм.н., доцента Гаврилова А.С. и к.фарм.н., доцента Кинева М.Ю. удостоверяем, что проведенные Словесновой Н.В. исследования по выбору оптимального состава и технологии получения внедрены в педагогическую и научно-исследовательскую деятельность кафедры фармации с «01» сентября 2024г в предмет «Фармацевтическая технология» в качестве примера влияния вспомогательных веществ на фармацевтико-технологические свойства таблеточных масс и получаемых таблеток, а также в предмет «Нормирование качества лекарств» в качестве примера теста растворение.

И.о. зав. каф. Фармации, д.фарм.н., доцент Петров А.Л.

Д.фарм.н., доцент кафедры фармации Гаврилов А.С.

К.фарм.н., доцент кафедры фармации Кинев М.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Распределение доли несоответствий по одному и нескольким показателям в зависимости от показателя несоответствия, 2016 год

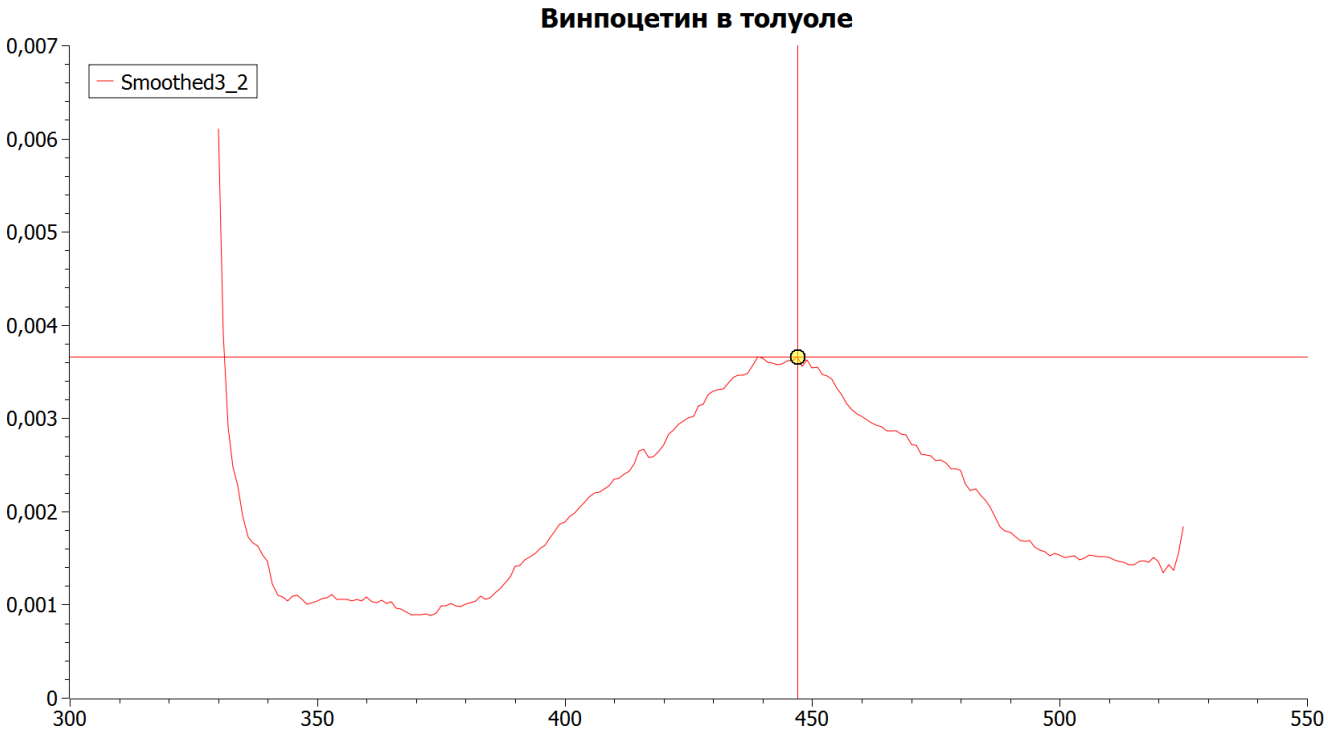
Показатель	Выявлено		С отзывом		Отозвано		Итого	
	наим.	%	наим.	%	наим.	%	наим.	%
Количественное определение	38	33,33	7	6,14	10	8,77	55	48,25
Посторонние примеси	22	19,30	13	11,40	23	20,18	58	50,88
Растворение	14	12,28	3	2,63	9	7,89	26	22,81
Описание	13	11,40	8	7,02	12	10,53	33	28,95
Средняя масса	11	9,65	3	2,63	2	1,75	16	14,04
Упаковка	11	9,65	6	5,26	10	8,77	27	23,68
Приостановление реализации	5	4,39					5	4,39
Распадаемость	4	3,51	1	0,88	1	0,88	6	5,26
Микробиологическая чистота	3	2,63	3	2,63	5	4,39	11	9,65
Однородность дозирования	3	2,63	2	1,75	2	1,75	7	6,14
Маркировка	2	1,75			5	4,39	7	6,14
Отзыв декларации о соответствии	1	0,88			13	11,40	14	12,28
Подлинность	2	1,76	6	5,26			8	7,02
Несоответствие декларации					1	0,88	1	0,88
Отзыв производителем					2	1,75	2	1,75
Отсутствие сертификата					1	0,88	1	0,88

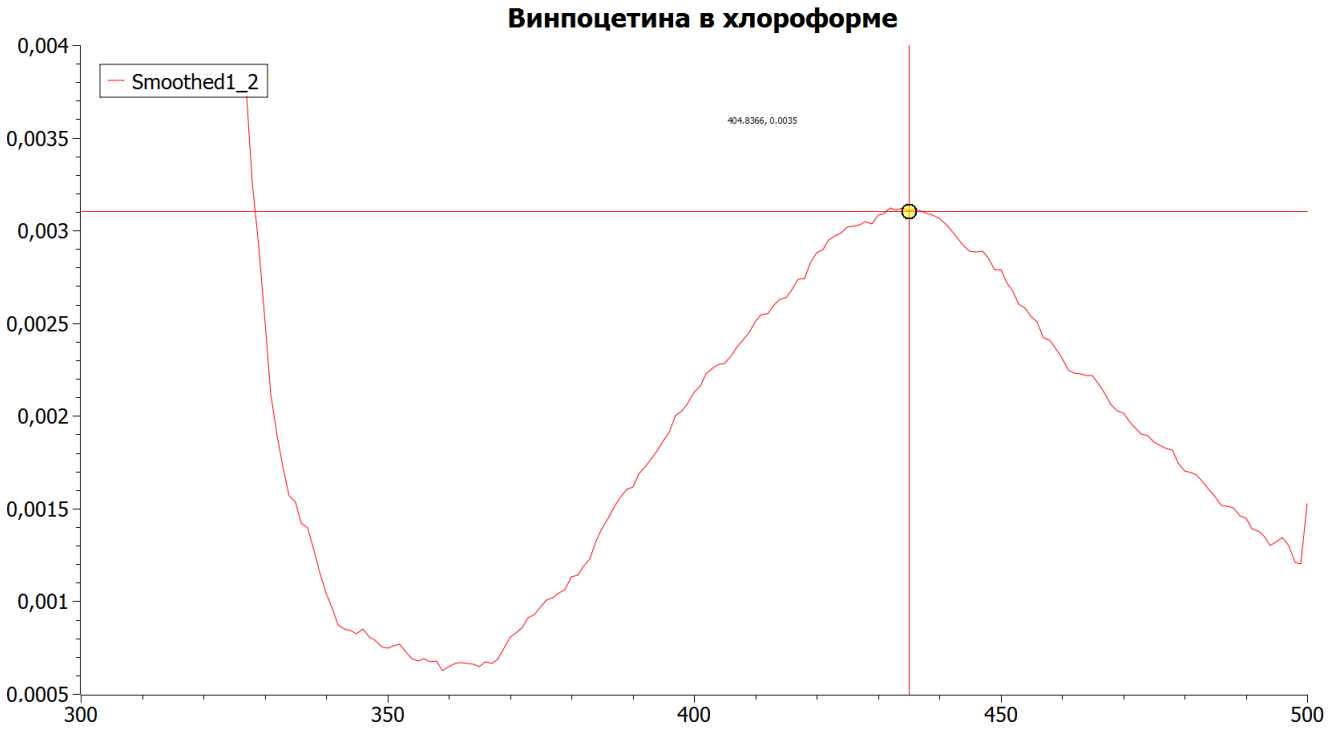
Для случаев несоответствия по двум и более признакам:

Показатель	Выявлено		В т. ч. с отзывом		Отозвано		Итого	
	наим.	%	наим.	%	наим.	%	наим.	%
Описание, упаковка	2	15,38					2	15,38
Подлинность, растворение	2	15,38	1	7,69			2	15,38
Подлинность. Растворение. Посторонние примеси, количественное определение	1	7,69	1	7,69	1	7,69	2	15,38
Посторонние примеси, количественное определение	1	7,69	1	7,69			1	7,69
Распадаемость. Растворение	3	23,08			1	7,69	4	30,77
Средняя масса. Распадаемость					1	7,69	1	7,69
Упаковка, маркировка					1	7,69	1	7,69

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Спектры по регистрации испускания при возбуждении при 365 нм в толуоле и в хлороформе





ПРИЛОЖЕНИЕ М

Условия для ацилирования терпеновых трилактонов

№	Среда	Катализатор	Режим нагрева	Сигналы исходных веществ	Обнаруженные продукты
1	Изопропанол	Нет	80º, 5 часов	Обнаружены все	Нет
2	Диоксан	КУ-1	85º, 5 часов	Сигнал гинкголида А имеет меньшую интенсивность	Аддукт аминометилпирена и гинкголида А
3	Диоксан	1М соляная кислота, 10 мкл	85º, 5 часов	Сигналы исходных веществ ниже, наблюдаются пики $M-H+Cl^-$	Аддукты амонометилпирена с гинкголидами А, B/J
4	Диоксан	10М соляная кислота, 500 мкл	85º, 15 часов	Сигналы исходных веществ ниже, наблюдаются пики $M-H+Cl^-$	Аддукты амонометилпирена с гинкголидами А, B/J, билобалидом
5	Толуол	КУ-1	140º, 2 часа	Сигналы исходных аналогичны сигналам опыта 4	Аддукт аминометилпирена и гинкголида А
6	Толуол	Трифторуксусная кислота	140º, 2 часа	Не наблюдались из-за интенсивной ионизации катализатора	?
7	Ксилол	10М соляная кислота, отгонка воды	Кипячение, 5 часов	Сигналы исходных веществ ниже, наблюдаются пики M-H+Cl	?
8	1М соляная кислота	Соляная кислота	Кипячение	Сигналы исходных веществ ниже, наблюдаются пики $M-H+Cl^-$	?

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Результаты определения сохранности действующих веществ в таблетированной форме до и после хранения

Показатель качества	Критерии спецификации	0 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
Описание	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.
Распадаемость	Не более 15 мин	13,73 ± 1,34 мин	13,82 ± 1,23 мин	13,70 ± 1,60 мин	13,91 ± 1,82 мин	14,03 ± 1,67 мин
Прочность на раздавливание	Не менее 30 Н	101,4 ± 20,3 Н	100 ± 18,3 Н	99,5 ± 20,7 Н	99,8 ± 17,5 Н	99,2 ± 18,6 Н
Колич. содержание винпоцетина	9,0–11,0 мг (90–110 %)	10,7 мг (100,7 %)	10,0 мг (99,8 %)	9,8 мг (98,1 %)	9,7 мг (97,3 %)	9,6 мг (96,2 %)
Колич. содержание флавоноидов	13,8–16,9 мг (90,0–110,0 %)	15,6 мг (101,7 %)	15,4 мг (100,3 %)	15,3 мг (99,5 %)	15,2 мг (98,8 %)	15,1 мг (98,1 %)
Примечание – Круглые плоскоцилиндрические таблетки светло-коричневого цвета с вкраплениями, с риской и фаской, с характерным запахом.						