

**ЗЕМЦОВА НАТАЛЬЯ ПЕТРОВНА**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ  
ПРЕПАРАТА ОБЩЕТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
НА ОСНОВЕ МАРЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ**

14.04.01 - технология получения лекарств

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Пермь - 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, профессор **Турецкова Вера Феопеновна**

**Официальные оппоненты:**

**Панкрушева Татьяна Александровна** - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической технологии, заведующий кафедрой;

**Прозорова Надежда Александровна** - кандидат фармацевтических наук, ООО «Парма Клиникал», исполняющий обязанности заместителя директора по фармацевтической разработке и регистрации.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Защита диссертации состоится « 24 » сентября 2019г. в «\_\_\_\_.00» часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. Тел./факс (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pgfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Марал - ценный и значимый вид животного для отрасли Алтайского края, являющийся источником для получения пантовой продукции и крупной экспортной составляющей во внешнеэкономической деятельности. Традиционно марала панты широко используются в странах Юго-Восточной Азии, а с конца 20 века мараловодство как отрасль появилась в России, Новой Зеландии, Австралии, Канаде (Луницын В.Г., 2004, Сыева С.Я., 2018). В настоящее время в России разведение маралов сосредоточено в Горном Алтае и предгорных районах Алтайского края, где ежегодно производится более 70% всей пантовой продукции России. На более 80 фермах разных форм собственности содержится свыше 70 тыс. оленей, от которых ежегодно получают более 60 тонн пантов (Луницын В.Г., 2018).

Учитывая значимость пантовой продукции, на Алтае были реализованы и продолжают действовать ряд государственных и региональных программ, которые стали основой комплексной переработки и грамотного продвижения пантовой продукции на территории края и в других регионах. Приоритетным направлением является уменьшение экспорта ценного сырья и увеличение объема переработки пантов для реализации на территории РФ (Лукьянов А.Н., 2015, 2017). Значимость пантовой продукции подтверждается проведением в 2018 году в Алтайском крае «Всемирного конгресса оленеводов» (Мукаева Л.Н., 2018).

Марала панты (*Antlers Cervus elaphus sibiricus*) содержат сложный комплекс биологически активных соединений с разнообразной биологической активностью, таких как: аминокислоты, липиды, нуклеиновые кислоты, гормоны, факторы роста и витамины (Yang Z. et al., 2012, Gu L. et al., 2008, Луницын В.Г., 2015, Zhao L. et al., 2009, Wang S. et al., 2016). Обращает на себя внимание тот факт, что основная масса биологически активных веществ марала пантов имеет белковую природу и, следовательно, их структура представлена аминокислотами.

Многолетний опыт народной медицины и изучение профилактического и лечебного действия марала пантов свидетельствует о том, что они обладают общетонизирующим, адаптогенным действием и применяются при упадке сил, умственных, физических нагрузках, при астенических состояниях, неврозах и после перенесенных травм (Александров В.В., 2003, Шорина Л. Н. и др., 2007, Луницын В.Г. и др., 2016).

Интерес к препаратам, получаемым на основе марала пантов, в России за последние годы резко возрос. В настоящее время качество марала пантов определяется ГОСТом 4227-76, большую часть пантов перерабатывают ряд крупных предприятий, таких как: ЗАО «Вифитех», ЗАО «Эвалар», они занимаются производством лекарственного средства – пантокрин, но в большинстве случаев производственные компании широко используют марала панты в измельченном виде для получения биологически-активных добавок, которые применяются внутрь в виде капсул, смесей с экстрактами растений и т.д. По мнению производителей, использование нативного сырья способствует сохранению комплекса биологически активных веществ (БАВ), обуславливающих многогранную фармакологическую активность марала пантов (Кошелев Ю.А. и др., 2018, Свиридов П.А. и др., 2018, Мухортов С.А., 2018).

Обращает на себя внимание тот факт, что в литературе отсутствуют сведения о разработке оптимального состава и рациональной технологии получения данных препаратов, оценка качества исходного сырья и готовой продукции проводится по товароведческим показателям (внешний вид, зола, влажность), при этом ни содержание основных групп биологически активных веществ, ни биологическая активность в

сырье и готовой продукции не определяется. Указанные требования нормативной документации не позволяют в полной мере оценить качество и подлинность исследуемого сырья. Анализ продукции фирм, выпускающих капсулированные формы с марала пантами измельченными, свидетельствуют о том, что в настоящее время нет единого мнения по выбору оптимальной дозы, их условиям хранения и срокам годности марала пантов измельченных.

Исходя из вышеизложенного, исследования по разработке технологии и стандартизации препарата на основе марала пантов измельченных представляются актуальными.

**Степень разработанности темы исследования.** Основная часть исследований по марала пантам в России и за рубежом посвящена их химическому и фармакологическому изучению. Отечественные исследования последних лет в области изучения продуктов пантового оленеводства в основном направлены на их применение в курортологии и восстановительном лечении (Александров В.А., 2003; Козлов Б.И., 2012, Кулишова Т. В. и др. 2013, 2018). В последние годы особое внимание зарубежными учеными уделяется способности марала пантов к регенерации и поиску биологически активных веществ, ответственных за данный процесс (Price J. et al., 2004). Кроме того, имеется ряд работ, посвященных разработке экстракционных препаратов на основе марала пантов (Gu L. et al., 2008, Луницын В.Г. и др., 2011). Но при этом, практически не освещенными остаются вопросы разработки оптимальной технологии и стандартизации препаратов на основе марала пантов измельченных.

**Цель и задачи исследования.** Разработка научно-обоснованной технологии препарата общетонизирующего действия на основе марала пантов измельченных и его стандартизация.

Для достижения поставленной цели требовалось решение следующих задач:

1. Получить марала панты измельченные с использованием традиционной технологии и провести оценку их качества.
2. Предложить современные методики качественного и количественного анализа аминокислот в марала пантах измельченных и провести их валидационную оценку.
3. Выбрать оптимальные способы дополнительной обработки марала пантов измельченных, обеспечивающие их надлежащую микробиологическую чистоту.
4. Изучить влияние выбранных способов дополнительной обработки марала пантов измельченных на содержание в них аминокислот и общетонизирующую активность.
5. Разработать рациональную технологию марала пантов измельченных, провести их стандартизацию и составить проекты нормативной документации.
6. Изучить стабильность марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и естественных условиях хранения.
7. Экспериментально обосновать состав и оптимальную технологию капсул «Пантокап», провести их стандартизацию, изучить стабильность и составить проекты нормативной документации.

**Научная новизна.** Впервые разработана научно-обоснованная технология получения марала пантов измельченных, осуществлен выбор оптимальной измельченности и способа дополнительной обработки марала пантов измельченных с целью обеспечения их надлежащего качества; впервые проведено изучение влияния различных видов дополнительной обработки (УФ - и СВЧ - излучение, термическая обработка, ионизирующее излучение, спирт этиловый) на микробиологическую чистоту марала пантов измельченных.

Впервые показано, что обработка ионизирующим излучением не оказывает влияния на общетонизирующую активность марала пантов измельченных и экспериментально обоснована их терапевтическая доза в капсулах «Пантокап». Подобран оптимальный состав капсулируемой массы на основе марала пантов измельченных.

Впервые для оценки качества марала пантов измельченных и капсулированного препарата на их основе предложена современная валидированная методика качественного анализа и количественного определения аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также показатели и нормы качества. Впервые изучено влияние внешних факторов (свет, температура, влажность) на стабильность марала пантов измельченных в стресс-условиях.

По результатам исследования получено свидетельство о государственной регистрации базы данных №2018622112 от 21.12.2018г «Технология получения и стандартизация пантов марала измельченных и капсул «Пантокап» на их основе».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы заключается в разработке научно-обоснованной технологии препаратов на основе марала пантов измельченных, обеспечивающих их стабильность, надлежащую микробиологическую чистоту и общетонизирующую активность.

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в разработке технологий марала пантов измельченных и препарата общетонизирующего действия на их основе в виде капсул «Пантокап». При этом установлена необходимость удаления кожного покрова, выбраны оптимальный размер частиц (не более 0,3 мм) и способ дополнительной обработки сырья (ионизирующее излучение), обеспечивающих надлежащее качество готового продукта, разработана технологическая схема с указанием критических контрольных точек.

Разработан состав капсулированного препарата с выбором вспомогательных веществ и выбран номер желатиновых капсул. Предложены показатели, нормы качества и современные валидированные методики определения основных аминокислот марала пантов измельченных и разработанного капсулированного препарата.

Разработаны проекты нормативной документации «Марала панты измельченные», «Капсулы Пантокап 0,20», лабораторные регламенты на производство марала пантов измельченных и капсул «Пантокап 0,20».

**Методология и методы исследования.** Методологический подход базируется на выполнении комплекса теоретических, технологических, физико-химических, биофармацевтических, микробиологических и фармакологических исследований, обеспечивающих разработку качественных, эффективных и безопасных средств.

**Положения, выносимые на защиту:**

- результаты оценки качества марала пантов измельченных, полученных по традиционной технологии;
- данные валидационной оценки и апробации методик качественного и количественного анализа аминокислот в марала пантах измельченных методом ВЭЖХ;
- данные по выбору оптимального способа дополнительной обработки марала пантов измельченных, обеспечивающие их надлежащую микробиологическую чистоту;
- результаты изучения влияния выбранного способа дополнительной обработки марала пантов измельченных на содержание в них аминокислот и их общетонизирующую активность;
- итоги изучения стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и естественных условиях хранения;

- результаты экспериментальных исследований по разработке технологии, состава и оценке качества марала пантов измельченных, капсул «Пантокап 0,20» на основе марала пантов измельченных, условий и сроков их хранения.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных, всероссийских конференциях и конгрессах, а также конференциях местного уровня: межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 145-летию курорта Белокуриха, 75-летию Алтайского края» (Белокуриха, 2012); юбилейной научно-практической конференции «Медицинская наука и здравоохранение», посвященная 60-летию АГМУ (Барнаул, 2014); научной конференции в рамках проведения Дня российской науки (Барнаул, 2014г., 2015г.); VIII международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2015); V юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2015); I междисциплинарном конгрессе «Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы её использования в медицине и спорте высших достижений» (Барнаул, 2015); IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2015); краевой научно-практической конференции «Фармация Алтай. Ретроспектива и взгляд в будущее» (Барнаул, 2015); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии» (Пятигорск, 2016); X международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2016).

**Внедрение результатов исследования.** На основании проведенных исследований разработаны: проект НД «Марала панты измельченные», проект НД «Капсулы Пантокап 0,20», лабораторный регламент на производство марала пантов измельченных и лабораторный регламент на производство капсул «Пантокап 0,20». Разработанные технологии получения марала пантов измельченных и капсул «Пантокап» апробированы с положительным результатом ООО «Алтайдар» (г. Барнаул) (акты от 09.04.2018г, 17.04.2018г). Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 15.01.2019г).

**Личный вклад автора.** Автор диссертационной работы принимал участие в выборе объектов исследования, постановке целей и задач, определении плана исследований. Самостоятельно осуществил поиск и анализ литературных данных, выполнил комплекс экспериментальных исследований, провел статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов. Экспериментальная работа осуществлялась автором лично, на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Автор на 90% является основным исполнителем исследования. Остальные 10%, а именно, определение микробиологической чистоты марала пантов измельченных проводилось в Барнаульском филиале ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту», обработка ионизирующим излучением осуществлялась в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук (г.Новосибирск), определение радионуклидов в ФГБУ «Центральная научно-производственная ветеринарная радиологическая лаборатория».

**Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-

исследовательских работ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (номер государственной регистрации - 01200600351).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 - технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1,3,4 паспорта специальности - технология получения лекарств.

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 17 статей, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ и международные базы цитирования.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 171 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, общих выводов и списка литературы, включающего 171 источник, в том числе 49 иностранных; содержит 33 таблицы, 25 рисунков, 12 приложения.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1. Обзор литературы.** Представлен обзор литературы, включающий общие сведения о марале (*Cervus elaphus sibiricus*) и марала пантах (*Cervi antlers*), способах их срезки, консервирования и переработки, а также сырьевой базе и современному состоянию пантового оленеводства. Особое внимание уделено исследованиям по изучению биологически активных веществ марала пантов, в том числе аминокислотам, липидному и минеральному составу, а также современным данным по выявлению таких групп биологически активных веществ, как простагландины, факторы роста и др. Представлены данные по применению марала пантов в отечественной и зарубежной медицине, фармакологической изученности препаратов марала пантов зарегистрированных в качестве лекарственных средств и биологически активных добавок (БАД).

**Глава 2. Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлись 5 серий марала пантов измельченных (МПИ), полученные из сырья 1-2 категории, консервированные по традиционной технологии (ГОСТ 4227-76) и удаленным кожным покровом. Все исследуемые субстанции представляли собой однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, характерным запахом. В качестве вспомогательных веществ использованы вещества, разрешенные к медицинскому применению в РФ и отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации: лудипресс (лактоза, Kollidon 30 и Kollidon CL) – НД 42-8803-05 (BASF, Германия); крахмал растворимый – ГОСТ 10163-76 («Вектон», Россия).

Для достижения поставленной цели были использованы различные методы изучения технологических характеристик порошков лекарственных субстанций и капсул (сыпучесть, насыпной объем, фракционный состав, влажность, зола, растворение, распадаемость), при этом использовали стандартные методики ГФ XIII изд. При анализе качественного состава и количественного определения аминокислот МПИ и капсулированной лекарственной формы, полученной на их основе, применяли современный метод анализа с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа марки LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония) с УФ-детектором (ВЭЖХ). Условия ВЭЖХ-анализа: неподвижная фаза - хроматографическая колонка PerfectChrom 100 C-18, 150×4,6 мм, размер частиц сорбента 5 нм с предколонкой Orbit 100 C-18, 2,6×4,6 мм размер частиц сорбента 5 нм, подвижная фаза: элюент А - ацетатный буфер 0,06моль/дм<sup>3</sup>, элюент Б - ацетонитрил 100% + 1% изопропилового

спирта; элюент С - ацетатный буфер 0,06моль/дм<sup>3</sup>; хроматографирование проводили в градиентном режиме, скорость потока подвижной фазы -130 мкл/мин, объем пробы – 20 мкл, температуре колонки 55 °С; детектирование - в УФ-области при длине волны 254 нм; продолжительность анализа – 30 мин.

Пробоподготовка объекта исследования заключалась в расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором фенилизотионата (ФИТЦ). Идентификацию веществ осуществляли по временам удерживания в сравнении со стандартными образцами (СО) аминокислот: глицин, пролин, оксипролин, аргинин, лизин, лейцин, треонин, валин, аспарагин, глутамин, фенилаланин, серин, гистидин, аланин, тирозин, изолейцин («Sigma», Германия).

*Обработку ионизирующим излучением* проводили на импульсном линейном ускорителе марки ИЛУ – 10 в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН в условиях, рекомендуемых для обработки лекарственного сырья ГФ XIII изд. ОФС.1.1.0016.15 «Стерилизация» (доза поглощения 10 кГр).

Микробиологическую чистоту МПИ и капсул на их основе определяли по методикам ГФ XIII изд., ч.1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» на базе Барнаульского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту».

Эксперименты на животных проводили на сертифицированных аутбредных крысах обоего пола (массой 180-220г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ. Экспериментальные исследования проводили при строгом соблюдении требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург,1986г), приказа МЗ РФ №199н от 01.04.2016г., «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств», «Методике оценки выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов» (Каркищенко В.Н. с соавт., 2013). На исследование получено разрешение Комитета по этике при ФГБОУ ВО «Алтайский Государственный Медицинский Университет» Минздрава РФ.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программ Statistica 6.1 и Microsoft Excel. Результаты физико-химических и технологических исследований (Р = 95%) обрабатывали при помощи критерия Стьюдента по стандартным методикам ГФ XIII изд.; данные фармакологических исследований – с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни и точного метода Фишера. Достоверными считали различия при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Глава 3. Получение марала пантов измельченных по традиционной технологии и оценка их качества с использованием современных валидированных методик.** В настоящее время существуют различные традиционные способы переработки сырья при получении МПИ. Одним из основных различий применяемых технологий является отсутствие или наличие в технологическом процессе стадии «удаление кожного покрова». В предварительных исследованиях было выявлено, что кожный покров ухудшает товарный вид сырья и при этом значительно обсеменен разнообразной микрофлорой. Поэтому, несмотря на то, что технология «без удаления кожного покрова» для производителей является более привлекательной с коммерческой точки зрения, так как удаление кожного покрова достаточно трудоемкий процесс, требующий дополнительных затрат, нами было дано предпочтение технологии «с удалением кожного покрова».

Исследуемая традиционная технология заключалась в следующем: марала панты консервированные по традиционной методике помещали на перфорированную поверхность на водяную баню и обрабатывали текучим паром в течение 10-15 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры, затем механическим способом удаляли кожный покров. Панты с удаленным кожным покровом подсушивали в сушильном шкафу марки СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М при температуре 50-60 °С в течение 2 часов, затем марала панты распиливали на куски 1-3 см ножовкой ручной («Inforce 06-08-07»). Полученные куски измельчали на кормоизмельчителе «Эликор-1».

*Выбор показателей качества марала пантов измельченных и методик их определения.* Как указывалось выше, качество марала пантов, полученных по традиционной технологии, контролируется по товароведческим показателям (ГОСТ 4227-76, ТУ), при этом биологическая активность и содержание основных групп биологически активных веществ (БАВ) в настоящее время не определяются. В связи с чем, в качестве основных показателей качества МПИ нами были выбраны: описание, потеря в массе при высушивании, зола общая, размер частиц, качественный состав и количественное содержание аминокислот и микробиологическая чистота, поэтому представляется целесообразным более детальное изучение одной из основных групп БАВ марала пантов измельченных, которыми являются аминокислоты, и выбор методики их определения с помощью современного метода анализа - ВЭЖХ.

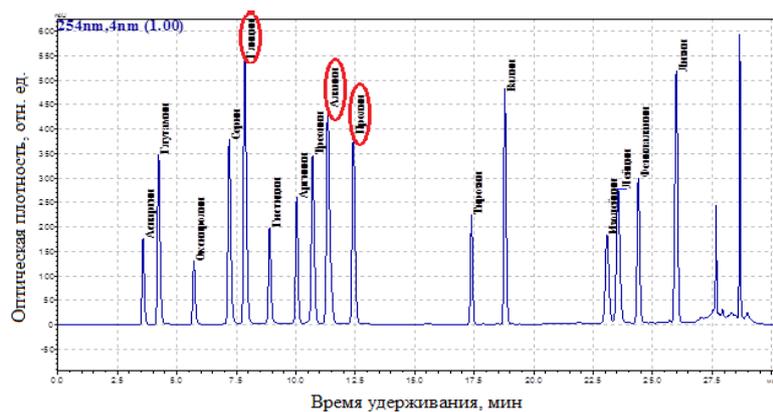
В основу разработки методики качественного и количественного определения аминокислот МПИ была положена методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом ВЭЖХ, предложенной ООО «Внедренческая фирма «АНАЛИТ» (Санкт-Петербург, 2007). Данная методика основана на расщеплении пептидных связей белка хлористоводородной кислоты раствором с последующей модификацией получаемых аминокислот фенилизотиоционатом (ФИТЦ) и дальнейшем разделении фенилтиокарбамильных производных аминокислот.

С целью экономии времени и расхода элюентов была уменьшена длина колонки и соответственно подобран градиент элюирования. Ниже приведены экспериментальные данные по валидационной оценке методик качественного анализа и количественного определения аминокислот в МПИ.

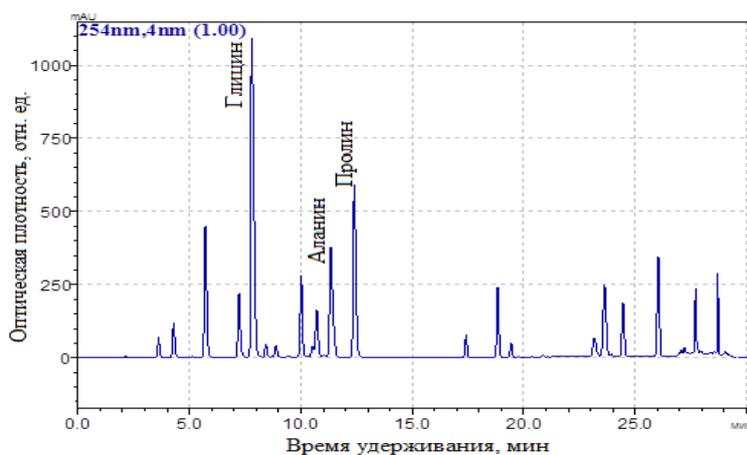
*Валидационная оценка методик качественного анализа аминокислот марала пантов измельченных.* Валидационную оценку методик качественного и количественного определения аминокислот проводили согласно ГФ 13 изд. ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по показателям: специфичность, пригодность, линейность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости.

*Качественный анализ. Специфичность методики* экспериментально устанавливали путем сопоставления результатов анализа образцов, содержащих сопутствующие вещества и СО. Результаты хроматографирования стандартного раствора аминокислот и исследуемого раствора фенилтиокарбамильных производных аминокислот (ФТК) при длине волны 254 нм в выбранных условиях представлены на рисунке 1.

Выявлено, что присутствие сопутствующих веществ не влияет на результаты анализа. Время удерживания ФТК-производных глицина (7,80 мин), аланина (11,34 мин), пролина (12,39 мин) в исследуемом образце, не существенно отличается от времени удерживания СО глицина (7,82 мин), аланина (11,31 мин), пролина (12,39 мин) (отклонение не превышает 0,5 %).



А



Б

**Рис. 1.** Хроматограмма стандартного раствора ФТК-производных СО аминокислот (А) и исследуемого раствора ФТК-производных аминокислот МПИ (Б).

Полученные спектральные отношения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе  $\pm 2$  нм. Установлено, что данные условия хроматографирования могут быть использованы для качественного анализа аминокислот методом ВЭЖХ в МПИ, так как экспериментальным путем доказаны *пригодность хроматографической системы и специфичность* (табл.1).

Таблица 1

**Параметры валидационной оценки методики качественного анализа аминокислот методом ВЭЖХ в марала пантах измельченных**

Критерий валидаций	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	Глицин	Аланин	Пролин	
<i>Специфичность</i>				
Отклонение времени удерживания от стандарта, %	0,014	0,021	0	не более 0,5%
<i>Пригодность хроматографической системы</i>				
Коэффициент асимметрии пика, $T$	1,82	1,55	1,37	$T \leq 2,0$
Коэффициент разделения пиков, $R_s$	2,42	2,08	2,58	$R_s > 1,5$
Эффективность хроматографической колонки т.т., $N$	14004	27776	41936	$N \geq 1000$
Коэффициент емкости, $K'$	5,27	812	8,97	$K' > 2,0$
Критерий воспроизводимости площадей пиков, ( $RSD$ ) %	0,49	0,81	0,92	$RSD \leq 2,0\%$

*Количественный анализ.* В основу количественного определения основных аминокислот методом ВЭЖХ в марала пантах измельченных была положена разработанная методика качественного анализа, так как она обеспечивает хорошее разделение анализируемого соединения и сопутствующих веществ. Валидационную оценку методики количественного определения аминокислот проводили по критериям: линейность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости. Расчет количественного содержания основных аминокислот (глицин, аланин, пролин) в марала пантах измельченных осуществляли с использованием метода абсолютной градуировки, при этом определялась зависимость между количеством введенного раствора СО аминокислот в различных концентрациях и площадью пиков на хроматограмме (табл.2).

Таблица 2

**Параметры валидационной оценки методики количественного определения аминокислот методом ВЭЖХ в марала пантах измельченных**

Критерий валидаций	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	Глицин	Аланин	Пролин	
<i>Линейность</i>				
Коэффициент корреляции	0,9998	0,9993	0,9999	0,9990
Уравнение регрессии	$y=6,7261e-0,009 \cdot x-0,0012288$	$y=8,106e-0,009 \cdot x-0,0030052$	$y=9,2015e-0,009 \cdot x-0,0011094$	$y = ax - b$
Диапазон концентраций, %	25-150	25-150	25-150	80-120%
<i>Правильность (результаты опытов с добавками)</i>				
Открываемость, %	98,13-101,86%	93,77-102,41%	97,44-102,07%	95-105%
<i>Прецизионность в условиях повторяемости</i>				
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,54	0,51	0,46	$RSD \leq 2,0$

Установлено, что методика количественного определения аминокислот в МПИ с использованием метода абсолютной градуировки по СО глицина, аланина, пролина может быть использована для оценки качества МПИ, так как экспериментальным путем установлены показатели линейности ( $R^2 = 0,9998$  (глицин),  $R^2 = 0,9993$  (аланин),  $R^2 = 0,9999$  (пролин), диапазона применения (от 25 до 150%), правильности ( $\bar{z} = 99,69 \pm 0,90\%$  глицин,  $\bar{z} = 98,92 \pm 1,46\%$  аланин,  $\bar{z} = 97,74 \pm 0,76\%$  пролин) и прецизионности в условиях повторяемости ( $RSD = 0,54\%$  (глицин),  $RSD = 0,51\%$  (аланин),  $RSD = 0,46\%$  (пролин)).

С применением валидированных методик в МПИ установлено и идентифицировано не менее 16 аминокислот, такие как: глицин, аланин, пролин, аспарагин, глютамин, оксипролин, серин, гистидин, аргинин, треонин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин и лизин. Среди которых превалируют три аминокислоты: глицин (время удерживания  $\tau = 7,80$ ), аланин (время удерживания  $\tau = 11,34$ ), пролин (время удерживания  $\tau = 12,39$ ), которые соответствуют пикам СО глицина, аланина и пролина ( $SD < 0,5\%$ ). Выявлено, что содержание основных аминокислот в исследуемых сериях МПИ варьирует в следующих пределах: глицина - от  $5,84 \pm 0,03\%$  до  $7,10 \pm 0,08\%$ ; аланина - от  $2,15 \pm 0,06\%$  до  $2,76 \pm 0,05\%$ ; пролина - от  $4,11 \pm 0,07\%$  до  $4,76 \pm 0,08\%$ .

*Оценка качества марала пантов измельченных, полученных по традиционной технологии.* Выявлено, что исследуемые серии МПИ, полученные по данной

технологии, обладают следующими показателями потери в массе при высушивании (от  $6,40 \pm 0,07\%$  до  $6,81 \pm 0,11\%$ ); золы общей (от  $32,73 \pm 0,15\%$  до  $36,22 \pm 0,05\%$ ); имеют размер фракционный состав с преобладанием частиц размером от 0,3 - 0,4 мм (от 34,26% до 36,15%), при этом присутствуют фракции 0,1 мм (от 0,75% до 0,95%), от 0,1 - 0,2 мм (от 3,88% до 5,43%), от 0,2 - 0,3 мм (от 10,21% до 11,12%), от 0,4 - 0,5 мм (от 31,85% до 32,85%), от 0,5 - 1,0 мм (от 12,26% до 14,52%), от 1,0 - 2,0 мм (от 2,5% до 3,12%).

*Подлинность марала пантов измельченных* оценивали по основной группе БАВ пантов марала - аминокислотам (глицин, аланин, пролин), с использованием валидированной нами методики (метод ВЭЖХ). Выявлено, что исследуемые серии МПИ содержат 16 производных аминокислот с преобладанием таких аминокислот, как глицин (время удерживания от 7,79 до 7,84), аланин (время удерживания от 11,33 до 11,35) и пролин (время удерживания от 12,39 до 12,44) ( $SD < 0,5\%$ ).

*Количественный анализ.* Установлено, что содержание глицина варьирует в пределах от  $5,82 \pm 0,08\%$  до  $6,95 \pm 0,15\%$ , аланина от  $2,19 \pm 0,09\%$  до  $2,71 \pm 0,07\%$  и пролина от  $4,12 \pm 0,05\%$  до  $4,67 \pm 0,09\%$ .

Но при этом результаты исследований показали, что МПИ, полученные по традиционной технологии, не соответствуют требованиям ГФ XIII изд. ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»: общее число аэробных бактерий и энтеробактерий превышает требуемые показатели (не более  $10^4$  Кое/г, не более  $10^2$  в 1г) и составляет  $2,6 \times 10^4$  Кое/г и  $10^3$  в 1г соответственно. Одновременно выявлено, что все серии МПИ отвечают требованиям по показателям «общее число грибов» и *Esherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphilococcus aureus* при их отсутствии.

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что в технологический процесс получения МПИ должны быть введены дополнительные стадии по обеспечению надлежащей измельченности и микробиологической чистоты конечного продукта. В связи с чем, было решено использовать для измельчения мельницу шаровую МШ-100 и выявить оптимальный способ дополнительной обработки сырья.

**Глава 4. Разработка технологии, стандартизация и изучение стабильности марала пантов измельченных.** Ниже приведены экспериментальные данные по разработке научно-обоснованной технологии получения МПИ, изучению микробиологической обсемененности исследуемого сырья, поиску методов дополнительной обработки сырья и выявлению факторов внешней среды, оказывающих влияние на показатели качества и стабильность полученного продукта.

*Влияние дополнительной обработки на микробиологическую чистоту марала пантов измельченных.* С целью снижения микробиологической обсемененности МПИ, были изучены следующие виды дополнительной обработки, используемые предприятиями по переработке марала пантов: термическая (сушильный шкаф марки СНОЛ - 3,5.3,5.3,5/3,5 - И1М, 60°C, 240 мин); УФ-излучение (облучатель хроматографический УФС 254/365 при длине волны 254 нм, 180 мин и 360 мин); СВЧ-излучение (микроволновая печь DAEWOO мощностью 700 Вт, 0,7 мин); ионизирующее излучение (импульсный линейный ускоритель ИЛУ - 10, 10 кГр, 0,3 мин); спирт этиловый 70% и 90% (5-10 мин). Оценку качества ПМИ проводили по вышеуказанным показателям (табл. 3).

Результаты проведенных исследований указывает на то, что требование по микробиологической чистоте в процессе получения марала пантов измельченных обеспечивается только в результате воздействия ионизирующего излучения и после обработки спиртом этиловым (70% и 90%). В связи с экономической нецелесообразностью применения спирта этилового для обработки МПИ и

возможностью частичной потери БАВ, в дальнейших исследованиях было решено использовать ионизирующее излучение.

Исходя из вышеизложенного, представляло интерес изучение влияния указанного способа дополнительной обработки на качественный и количественный состав аминокислот и общетонизирующую активность МПИ.

*Влияние ионизирующего излучения на качественный и количественный состав аминокислот* марала пантов измельченных проводили с использованием вышеуказанных валидированных методик. Установлено, что марала панты после обработки ионизирующим излучением (10 кГр, 20 с) имеют одинаковый качественный и количественный состав аминокислот, характерный для исходного сырья. Установлено наличие 16 производных аминокислот, среди которых отмечены пики трех основных аминокислот МПИ (глицин ( $\tau = 7,81$ ), пролин ( $\tau = 11,34$ ), аланин ( $\tau=12,42$ )), количественное содержание которых после дополнительной обработки исследуемым способом практически не меняется (глицин  $6,31 \pm 0,12$ , аланин  $2,79 \pm 0,03$ , пролин  $4,75 \pm 0,08$ ).

*Влияние ионизирующего излучения на общетонизирующую активность.* Эксперименты проводили на 30 аутбредных крысах-самках, которые были разделены рандомизированно на 3 групп по 10 особей. Контрольная группа крыс ежедневно получала плацебо в виде хлебного шарика объемом  $1\text{см}^3$ . Животные второй группы получали плацебо с МПИ в дозе 200 мг/кг «без дополнительной обработки»; животные третьей экспериментальной группы, получали аналогичные исследуемые образцы, подвергнутые дополнительной обработке. Все группы животных с грузом 10% от массы тела один раз в сутки запускались в емкость с водой при температуре  $27-29^\circ\text{C}$  через один час после получения плацебо или исследуемых образцов пантов марала на 3, 7, и 10 день эксперимента. Фиксировалось время их нахождения в воде до момента, когда животные были уже не в состоянии удерживаться над поверхностью воды самостоятельно и начинали тонуть.

Установлено, эффект повышения выносливости сохранялся после приема исследуемых серий, прошедших дополнительную обработку ионизирующим излучением. Так, на 10 день эксперимента прирост времени плавания крыс составил – 22,1% (контрольная группа), 50,5% (вторая экспериментальная группа) и 49,8% (третья экспериментальная группа). Таким образом, исследования, проведенные на лабораторных животных, позволяют утверждать, что МПИ после обработки ионизирующим излучением сохраняют общетонизирующую активность.

Выявлено, что МПИ, полученные по разработанной технологии, соответствуют предъявляемым требованиям по показателям описание, измельченность (не более 0,3 мм, фракции 0,1 мм не более 2%), потеря в массе при высушивании (не более 7%), зола общая (не более 36%), подлинность (на хроматограмме 16 пиков производных аминокислот в том числе три пика с  $\tau=7,81$  мин глицин,  $\tau=11,34$  мин аланин,  $\tau=12,42$  мин пролин), содержание аминокислот (глицин не менее 5%, аланина не менее 2%, пролина не менее 4%), микробиологическая чистота (категория 3Б).

*Оценка стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний.* Испытание стабильности в условиях стресс-испытаний проводили на основании наличия или отсутствия изменений основных показателей качества (описание, потеря в массе при высушивании, качественное обнаружение и количественное содержание аминокислот), возникших в результате воздействия деструктирующих факторов: естественный солнечный свет; искусственный свет, УФ - излучении (254 нм), повышенной температуры, повышенной влажности согласно требований ГФ XIII изд. ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств».

**Сравнительная характеристика микробиологической чистоты марала пантов измельченных после различных видов  
дополнительной обработки**

№ п/ п	Исходные показатели обсемененности	Показатели после дополнительной обработки			Соответствие требованиям ГФ XIII изд. ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (категория ЗБ)
		Общее число аэробных бактерий, Кое/г	Общее число грибов, Кое/г	Энтеробактерии, Кое/г	
<b>Термическая обработка</b>					
1	<i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> $2,6 \times 10^4$ в 1г <i>Общее число грибов, Кое/г</i> Менее $10^2$ в 1г <i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Более $10^3$ в 1г	<b><math>1,1 \times 10^5</math></b>	Менее $10^2$	<b>Более <math>10^3</math></b>	<b>Не соответствует категории ЗБ по содержанию аэробных бактерий и энтеробактерий</b> <i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> Не более $10^4$ в 1г <i>Общее число грибов, Кое/г</i> Не более $10^2$ в 1г <i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Не более $10^2$ в 1г
<b>УФ излучение (время воздействия 180 мин)</b>					
2	То же	<b><math>1,7 \times 10^4</math></b>	Менее $10^2$	<b>Более <math>10^3</math></b>	То же
<b>УФ излучение (время воздействия 360 мин)</b>					
3	То же	<b><math>1,7 \times 10^4</math></b>	Более $10^2$	<b>Более <math>10^3</math></b>	То же
<b>СВЧ-излучение</b>					
4	То же	<b><math>2,9 \times 10^4</math></b>	Менее $10^2$	<b>Более <math>10^3</math></b>	То же
<b>Ионизирующее излучение</b>					
5	То же	$1 \times 10^2$	Менее $10^1$	Менее $10^1$	Соответствует категории ЗБ
<b>Спирт этиловый 70%</b>					
6	То же	$2,4 \times 10^2$	Менее $10^1$	Менее $10^1$	Соответствует категории ЗБ
<b>Спирт этиловый 90%</b>					
7	То же	$4,1 \times 10^2$	Менее $10^1$	Менее $10^1$	Соответствует категории ЗБ

Выявлено, что воздействие естественного дневного и искусственного света, а также повышенной влажности воздуха (100%) и температуры (70°C) приводит к снижению количественного содержания всех аминокислот (от 17 % до 45 %) при сохранении их качественного состава, что следует учитывать при организации технологического процесса и дальнейшего хранения МПИ (табл.4).

В условиях *естественного хранения* при относительной влажности воздуха не более 60% и температуре 15-25 °С вышеуказанные показатели качества МПИ или не изменялись, или находились в пределах ошибки опыта в течение 1,5 лет. Рекомендуемый предварительный срок годности МПИ равен 1 году.

Таблица 4

**Сравнительная оценка количественного содержания основных аминокислот в марала пантах измельченных до и после воздействия различных деструктирующих факторов**

№ п/п	Деструктирующие факторы	Содержание аминокислот, %		
		Глицин	Аланин	Пролин
1	До воздействия	6,35 ± 0,16	2,30 ± 0,03	4,76 ± 0,09
2	Естественный свет	4,81 ± 0,22	1,29 ± 0,02	4,16 ± 0,19
3	Искусственный свет	4,80 ± 0,23	1,72 ± 0,06	4,48 ± 0,13
4	УФ-излучение (длина волны 254 нм)	6,13 ± 0,21	2,20 ± 0,06	4,34 ± 0,20
5	Относительная влажность воздуха 100%	5,54 ± 0,12	1,25 ± 0,01	4,15 ± 0,13
6	Температура 70 °С	5,22 ± 0,21	1,61 ± 0,07	3,33 ± 0,20

На основе экспериментальных данных разработана рациональная технология получения МПИ с включением стадий отсева фракций размером более 0,3 мм и дополнительной обработкой ионизирующим излучением. Результаты исследований были положены в основу разработки технологической схемы получения марала пантов измельченных, лабораторного регламента и проекта НД «Марала панты измельченные» (рис.2).

*Исследования острой токсичности.* Выявлено, что МПИ согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу опасности (малоопасные вещества), т.к. при изучении острой токсичности изучаемого препарата при энтеральном введении мышам (2500-5000 мг/кг) симптомов отравления не наблюдалось, летальность отсутствовала, что не позволило установить ЛД<sub>50</sub>.

**Глава 5. Разработка состава и технологии капсул «Пантокап», стандартизация и изучение стабильности.** Учитывая тот факт, что рекомендуемая разовая доза МПИ в выпускаемых в настоящее время БАД варьирует и находится в пределах от 50 мг до 200 мг, возникла необходимость проведения исследований по выбору рациональной дозировки МПИ для разработки состава капсулированного препарата на их основе.

*Выбор рациональной дозы марала пантов измельченных.* Эксперименты по изучению зависимости общетонизирующей активности МПИ от применяемой дозы (50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг) проводили по вышеописанной методике. Животные (крысы-самки, вес 180-200 гр) были разделены на 4 группы: контрольная группа ежедневно получала плацебо, животные первой, второй и третьей экспериментальных групп получали МПИ в дозах: 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг один раз в сутки в течение 6 суток.

Выявлено, что существенной зависимости выраженности фармакологического эффекта от диапазона использованных дозировок выявлено не было. Так к концу эксперимента время плавания животных первой экспериментальной группы составило  $19,7 \pm 0,39$  мин ( $p < 0,05\%$ ), второй –  $29,4 \pm 0,46$  мин ( $p < 0,05\%$ ) и третьей –  $23,9 \pm 0,55$  мин ( $p < 0,05\%$ ), при этом прирост времени плавания по сравнению с исходными показателями каждой группы составил 74,8%, 88,5% и 61,5% соответственно. На основании полученных результатов установлено, что максимальные значения как абсолютных, так и относительных величин прироста времени плавания отмечался на 6 сутки эксперимента в дозе 100 мг/кг.

*Изучение технологических свойств марала пантов измельченных.* Результаты исследований по изучению технологических свойств МПИ позволили сделать заключение, что марала панты обладают неудовлетворительной сыпучестью ( $4,46 \pm 0,12$  г/сек, угол естественного откоса  $47,10 \pm 0,15^\circ$ ); насыпной плотностью ( $0,769 \pm 0,015$  г/см<sup>3</sup>); невысоким показателем потери массы при высушивании ( $6,67 \pm 0,06$  %) и высокой гигроскопичностью ( $12,36 \pm 0,01\%$ ).

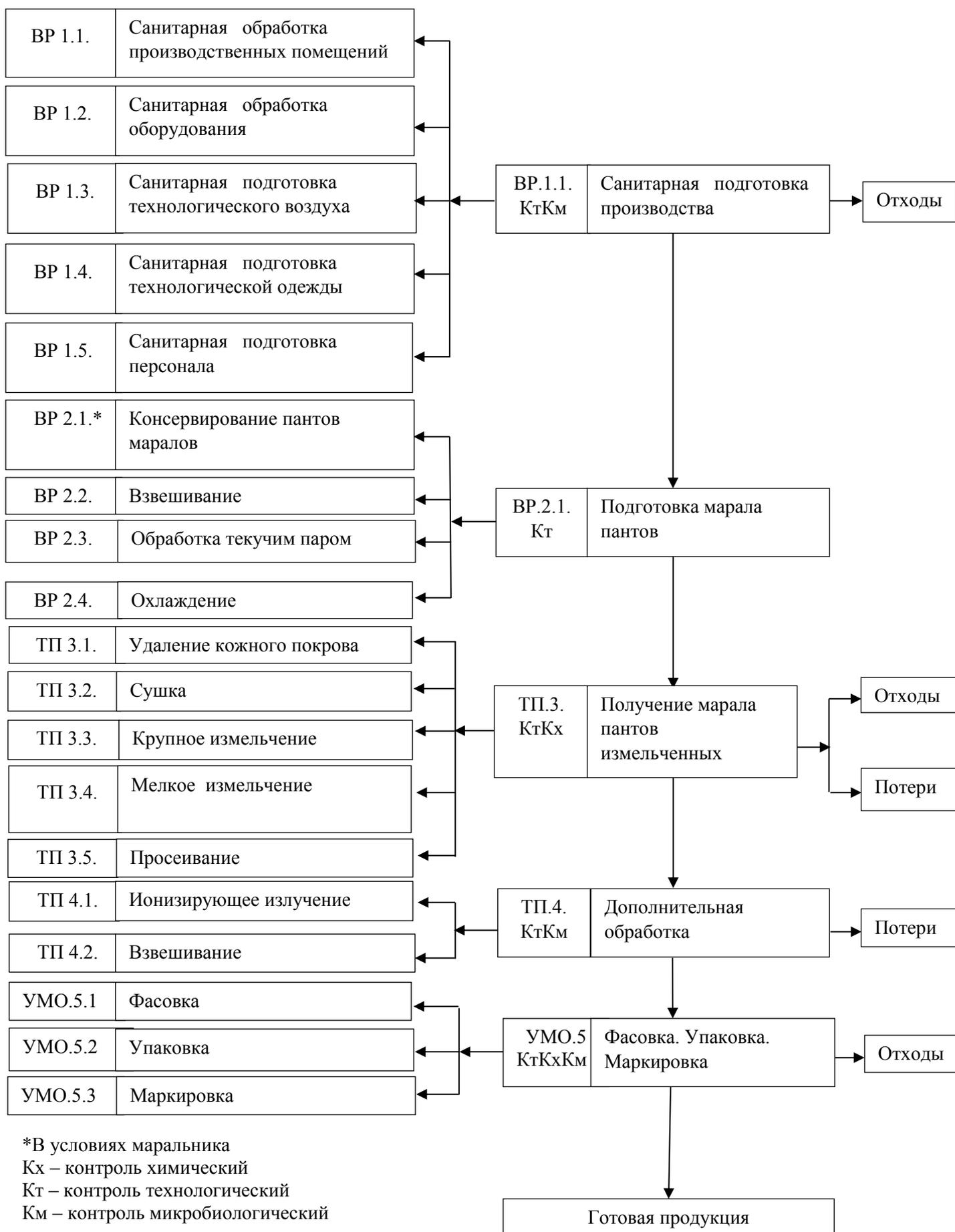
Учитывая тот факт, что данные по неудовлетворительной сыпучести были получены на основании одного показателя, указанного в ГФ XIII изд. (угол естественного откоса), были проведены более подробные расчеты. По значению насыпной плотности определяли степень текучести порошка. Для этого рассчитывали отношение Хауснера и индекс Карра. Согласно данным расчетам марала панты измельченные обладают очень хорошей текучестью: Индекс Хауснера  $H=1,077$ , Индекс Кара  $I=7,15$ .

*Выбор состава прописи капсул «Пантокап».* С учетом приведенных технологических свойств марала пантов измельченных было разработано и получено 2 прописи, в состав которых включили различные количества вспомогательных веществ (лудипресс (BASF, Германия), крахмал растворимый («Вектон», Россия)), снижающих гигроскопичность и изучены их технологические свойства (табл.5).

При сопоставлении полученных данных по технологическим показателям изучаемых смесей (табл. 5) было сделано заключение, что наиболее рационально изготавливать капсулы с МПИ по прописи №2 (марала панты измельченные - 0,20, крахмала растворимого - 0,15), так как данная пропись обеспечивает одновременно высокие показатели индексов Карра и Хауснера, при этом удовлетворительную сыпучесть ( $6,63 \pm 0,06$  г/сек, угол естественного откоса  $38,30 \pm 0,10^\circ$ ), более высокий показатель насыпной плотности, низкие показатели потери в массе при высушивании ( $6,12 \pm 0,02\%$ ) и гигроскопичности ( $7,30 \pm 0,01\%$ ), по сравнению с исходными показателями сырья. Расчеты показали, что для капсулирования терапевтической дозы МПИ по прописи №2 необходимо использовать капсулы №1.

*Оценку качества капсул «Пантокап 0,20»* проводили по показателям, регламентируемым ГФ XIII изд. ОФС «Капсулы»: описание, подлинность (наблюдаются пики со временем удерживания  $\tau = 7,83$  мин,  $11,32$  мин и  $12,40$  мин, которые соответствуют пикам СО глицина, аланина, пролина ( $SD < 0,5\%$ )), средняя масса капсулы (от  $0,415$  г до  $0,427$  г), тест «Распадаемость» (не более 30 мин), «Растворение» (от  $81,57 \pm 2,05\%$  до  $83,56 \pm 2,15\%$ ), количественное содержание (глицина – не менее  $0,0014$  г; аланина – не менее  $0,00103$  г; пролина – не менее  $0,00061$  г), микробиологическая чистота (категория 3Б).

Установлена стабильность капсул «Пантокап 0,20» в условиях естественного хранения в течение 1,5 лет (предварительный срок годности – 1 год). Результаты исследований были положены в основу разработки технологической схемы получения капсул «Пантокап 0,20», лабораторного регламента и проекта НД «Пантокап 0,20».



**Рис. 2** Технологическая схема получения марала пантов измельченных

Таблица 5

## Сравнительная оценка технологических свойств изучаемых прописей с марала пантами измельченными

№ п/п	Сыпучесть, г/сек	Угол естественного откоса, °	Отношение Хауснера	Индекс Карра	Насыпная плотность, г/мл		Потеря в массе при высушивании, %	Гигроскопич- ность, %
					До уплотнения	После уплотнения		
Марала панты измельченные	4,46±0,12	47,10± 0,15	1,07	7,15	0,714±0,017	0,769±0,015	6,67±0,06	12,36±0,01
Пропись 1	5,36± 0,05	46,20±0,14	1,10	9,15	0,695±0,038	0,765±0,040	8,51± 0,07	10,94± 0,08
Пропись 2	6,63±0,06	38,30± 0,10	1,08	7,56	0,770±0,023	0,833±0,018	6,12± 0,02	7,30± 0,01

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Марала панты измельченные, полученные по традиционной технологии, имеют фракционный состав с преобладанием частиц размером от 0,3 до 0,4 мм, содержат 16 производных аминокислот с преобладанием глицина, аланина и пролина, содержание которых варьирует в пределах от  $5,82 \pm 0,08\%$  до  $6,95 \pm 0,15\%$ , от  $2,19 \pm 0,09\%$  до  $2,71 \pm 0,07\%$  и от  $4,12 \pm 0,05\%$  до  $4,67 \pm 0,09\%$  соответственно, при этом не соответствуют требованиям ГФ XIII изд. по показателю «Микробиологическая чистота»: общее число аэробных бактерий и энтеробактерий превышает требуемые показатели.

2. Методика определения массовой доли аминокислот методом ВЭЖХ может быть использована для качественного и количественного анализа основных аминокислот в марала пантах измельченных, так как экспериментальным путем доказаны пригодность хроматографической системы, специфичность (отклонение – 0,014% (глицин), 0,021% (аланин), 0% (пролин)); линейность ( $R^2 = 0,9998$  (глицин),  $R^2 = 0,9993$  (аланин),  $R^2 = 0,9999$  (пролин)); диапазон применения (от 25 до 150%); правильность ( $z = 99,69 \pm 0,90\%$  глицин,  $z = 98,92 \pm 1,46\%$  аланин,  $z = 97,74 \pm 0,76\%$  пролин) и прецизионность в условиях повторяемости ( $RSD = 0,54\%$  (глицин),  $RSD = 0,51\%$  (аланин),  $RSD = 0,46\%$  (пролин)).

3. Установлено, что в марала пантах измельченных содержится не менее 16 аминокислот, такие как: глицин, аланин, пролин, аспарагин, глютамин, оксипролин, серин, гистидин, аргинин, треонин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин и лизин. Среди которых преобладают три аминокислоты: глицин ( $\tau = 7,81$ , аланин ( $\tau = 11,34$ ), пролин ( $\tau = 12,42$ ), содержание которых в исследуемых сериях пантах марала измельченных варьирует в следующих пределах от  $5,84 \pm 0,03\%$  до  $7,10 \pm 0,08\%$ ; от  $2,15 \pm 0,06\%$  до  $2,76 \pm 0,05\%$ ; от  $4,11 \pm 0,07\%$  до  $4,76 \pm 0,08\%$  соответственно.

4. Выявлено, что дополнительная термическая обработка ( $60^\circ\text{C}$ , 240 мин), а также обработка УФ - излучением (при длине волны 254 нм, 180 мин и 360 мин) и СВЧ - излучением (700 Вт, 0,7 мин) не обеспечивают требуемую микробиологическую чистоту марала пантов измельченных. Сырье, обработанное ионизирующим излучением и спиртом этиловым 70% и 90%, соответствует требованиям ГФ XIII изд., ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (категория 3Б). Экономически целесообразным и более выгодным является применение ионизирующего излучения.

5. Оптимальным способом дополнительной обработки марала пантов измельченных является ионизирующее излучение (10 кГр, 0,3 мин), так как экспериментальным путем доказано, что оно не влияет на качественный и количественный состав аминокислот, характерный для исходного сырья и сохраняет общетонизирующую активность в дозе 200 мг/кг.

6. На основании экспериментальных данных разработана рациональная технология получения марала пантов измельченных с включением дополнительной обработки ионизирующим излучением. Марала панты измельченные, полученные по разработанной технологии, соответствуют требованиям проекта НД «Марала панты измельченные» по показателям описание, подлинность, содержание аминокислот (глицин не менее 5%, аланин не менее 2%, пролин не менее 4%), размер частиц порошка (не более 0,3 мм, пылевидной фракции не более 2%), потеря в массе при высушивании (не более 7%), зола общая (не более 36%), микробиологическая чистота (категория 3Б).

7. В результате исследований по изучению влияния факторов окружающей среды на стабильность физико-химических показателей марала пантов измельченных в стресс-условиях установлено, что воздействие естественного дневного и искусственного света, а также повышенной влажности воздуха (100%) и температуры ( $70^\circ\text{C}$ ) приводит к

снижению количественного содержания аминокислот (от 17% до 45%), что следует учитывать при организации производства и хранения марала пантов измельченных. Предварительные сроки годности в условиях естественного хранения составили – 1 год.

8. В ходе фармакологических исследований установлено, что марала панты измельченные относятся к IV классу опасности (малоопасные вещества) согласно ГОСТу 12.1.007-76. Общетонизирующая активность марала пантов измельченных, установленная с помощью «Методики оценки выносливости мелких лабораторных животных», проявлялась в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг до 200 мг/кг, при этом максимальное увеличение общетонизирующей активности отмечалось в дозе 100 мг/кг.

9. В результате комплекса проведенных технологических и биофармацевтических исследований выбран оптимальный состав, разработана технология получения капсул «Пантокап», соответствующих требованиям ГФ XIII изд. и проекта НД «Пантокап капсулы 0,20» по следующим показателям: описание, подлинность, количественное содержание (глицина – не менее 0,0014 г; аланина – не менее 0,00103 г; пролина – не менее 0,00061 г), средняя масса капсулы (от 0,415г до 0,427г), тест «Распадаемость» (не более 30 мин), тест «Растворение» (не менее 75+5%), микробиологическая чистота (категория 3Б). Предварительные сроки годности в условиях естественного хранения для капсул «Пантокап» – 1 год.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Земцова, Н. П. Анализ состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, В. Ф. Турецкова // Перспективы развития санаторно-курортной помощи и реабилитации в Сибирском регионе: материалы межрегион. науч.-практ. конференции, посвящ. 145-летию юбилею курорта Белокуриха, 75-летию Алт. края / под ред. Т. В. Кулишовой. – Белокуриха, 2012. – С. 102–103.

2. Земцова, Н. П. Анализ способов получения экстракционных препаратов на основе пантов марала, изюбря и оленя / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармакологии и фармации: ежегод. сборник науч. и метод. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2012. – Вып. 9. – С. 36–43.

3. Лунин, К. П. Сравнительный анализ качественного состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ / К. П. Лунин, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник науч. тр. – Волгоград, 2013. – Вып. 68. – С. 257–259.

4. **Земцова, Н. П. Сравнительная общетонизирующая активность измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, Я. Ф. Зверев, В. Ф. Турецкова // **Фундаментальные исследования.** – Москва, 2014. – С. 100–103 ; То же [Электронный ресурс]. – URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=34118> (дата обращения: 24.10.2018).**

5. Медведева, Л. С. Анализ технологических свойств измельченных пантов марала / Л. С. Медведева, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2014. – Вып. 11. – С. 82–87.

6. Касаткина, А. И. Изучение физико-химических показателей и микробиологической чистоты измельченных пантов марала, полученных без удаления кожного покрова / А. И. Касаткина, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные

проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2015. – Вып. 12. – С. 77–82.

7. Земцова, Н. П. Сравнительная оценка эффективности измельченных пантов марала и крови марала высушенной / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, Я. Ф. Зверев, В. Ф. Турецкова // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2015 г.). – Санкт-Петербург, 2015. – С. 416–418.

8. Земцова, Н. П. Влияние курсового введения измельченных пантов марала на адаптогенную активность у крыс / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев // Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник науч. трудов по материалам VIII Междунар. науч.-практ. конф. 27 февр. 2015 г.: в 7 ч. / под общ. ред. М. Г. Петровой. – Белгород, 2015. – Ч. I. – С. 112–115.

9. Земцова, Н. П. Проблемы и перспективы совершенствования оценки качества препаратов на основе пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений: материалы I Междисциплинар. конгресса, 10 сент. 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск; Барнаул, 2015. – С. 23–26.

10. Земцова, Н. П. Перспективы применения продуктов пантового оленеводства в спортивной медицине / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, В. Ф. Турецкова // Беликовские чтения: материалы IV Всерос. науч.-практ. конференции (Пятигорск, 1-2 дек. 2015г.). – Пятигорск, 2015. – С. 65–66.

**11. Земцова, Н. П. Определение аминокислот в пантах марала: валидация методики / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, О. Г. Макарова // Фармация. – Москва, 2016. – № 4. – С. 38–41.**

12. Земцова, Н. П. Влияние дополнительной обработки на показатели качества измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Современные тенденции развития науки и технологий: по материалам X Междунар. науч.-практ. конференции (г. Белгород, 31 янв. 2016): период. науч. сборник / редкол.: Н. А. Духно, Ф. П. Васильев, З. Г. Алиев. – Белгород, 2016. – № 1-3. – С. 43–46.

**13. Земцова, Н. П. Стабильность измельченных пантов марала в условиях стресс-испытаний / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, О. Г. Макарова // Фармация. – Москва, 2016. – № 8. – С. 25–27.**

14. Воробьева, С. Р. Сравнительная оценка показателя «описание» измельченных пантов марала 1 и 4 категорий при макроскопическом и микроскопическом изучении / С. Р. Воробьева, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2016. – Вып. 13. – С. 40–51.

15. Земцова, Н. П. Изучение влияния кожного покрова на качество измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2016. – Вып. 13. – С. 63–71.

16. Земцова, Н. П. Основные направления повышения качества препаратов на основе измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные

вопросы современной фармацевтической технологии: материалы Всерос. науч.-практ. конференции с междунар. участием. – Пятигорск, 2016. – С. 29–33.

17. Земцова, Н. П. Изучение влияния способов дополнительной обработки измельченных пантов марала на общетонизирующую активность / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев // Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, которые содержат компоненты природного происхождения: материалы I Междунар. науч.-практ. интернет-конференции, (Харьков, 5 апреля 2018 г.): тезисы. – Харьков, 2018. – С. 49–50. – Текст парал. на укр. и рус. языках.

Земцова Наталья Петровна (Россия)

**Разработка технологии и стандартизация препарата общетонизирующего действия на основе марала пантов измельченных**

Проведены исследования по выбору оптимального состава и разработке научно обоснованной технологии получения марала пантов измельченных и капсулированной лекарственной формы на их основе. Предложены современные методики качественного и количественного анализа аминокислот в марала пантах измельченных и проведена их валидационная оценка. Разработана научно-обоснованная технология получения марала пантов измельченных, при этом осуществлен выбор оптимального способа дополнительной обработки с целью обеспечения надлежащей микробиологической чистоты, который не оказывает влияния на содержание аминокислот и общетонизирующую активность, предложены показатели качества и их нормы. Изучено влияние факторов окружающей среды (стресс-испытания и естественные условия) на стабильность показателей качества марала пантов измельченных. Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены состав и технология получения капсулированной лекарственной формы с марала пантами измельченными.

Zemtsova Natalya Petrovna (Russia)

**Technology development and standardization of the preparation with a general tonic action based on crushed Siberian stag antlers**

The studies were conducted on the choice of the optimal composition and the development of a scientifically grounded technology for the production of crushed Siberian stag antlers and a capsulated pharmaceutical dosage form based on them. Modern methods of the qualitative and quantitative analysis of amino acids in crushed Siberian stag antlers were proposed and their validation assessment was carried out. The scientifically grounded technology for obtaining crushed Siberian stag antlers was developed. Besides, the optimal method of the additional processing was selected in order to ensure the proper microbiological purity without affecting the content of amino acids and a general tonic action, and quality indicators and their standards were proposed. The influence of environmental factors (stress tests and natural conditions) on the stability of quality indicators of crushed Siberian stag antlers was studied. The composition and the technology of obtaining a capsulated pharmaceutical dosage form with crushed Siberian stag antlers were theoretically substantiated and experimentally confirmed.