

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

БОРСУК СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 615.453.6:615.31'757'792].012/.014.07

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ НОВОГО
КОМБІНОВАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ З ТРИПТОФАНОМ ТА
ТІОТРИАЗОЛІНОМ**

15.00.03 – стандартизація та організація
виробництва лікарських засобів

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Запорізькому державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
КУЧЕРЕНКО ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
МЕРЗЛІКІН СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ
професор кафедри лікарської та аналітичної токсикології,
Національний фармацевтичний університет,
м. Харків

доктор фармацевтичних наук,
старший науковий співробітник
ЛЕОНТЬЄВ ДМИТРО АНАТОЛІЙОВИЧ
ДП «Український науковий фармакопейний центр якості
лікарських засобів», м. Харків, заступник директора з
наукової роботи, начальник відділу валідації та
стандартних зразків,

Захист відбудеться «01» лютого 2019 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «27» грудня 2018 р.

Учений секретар спеціалізованої
вченої ради, професор

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Проблема порушень когнітивних функцій і стресу завжди надавалося велике значення. Однак в останнє десятиріччя інтерес дослідників і практикуючих лікарів до вирішення цієї проблеми істотно зріс. Це пояснюється високим ростом показників стресів і емоційних напружень по всій Україні, особливо в Донецькій та Луганській областях, де проходять бойові дії через озброєний конфлікт на Сході країни, а також збільшенням пацієнтів з когнітивними розладами. На сьогодні в лікуванні вищезазначених порушень та ускладнень ЦНС здебільшого використовують анксиолітичні та стрес-протекторні лікарські засоби. Однак, їхнє застосування обмежено через відносну токсичність та низку побічних ефектів. Велику увагу в Європі та світі серед анксиолітичних лікарських засобів викликає структурний аналог нейротрансмітерів – L-триптофан. Дана незамінна амінокислота сприяє зняттю тривожності, гіперактивності, нав'язливих станів і синдрому хронічної втоми, підвищує настрій, усуває напругу і відчуття страху, покращує засинання і нормалізує сон. Але, даний лікарський засіб не виявляє ноотропної, стреспротективної і антиоксидантної дії та йому притаманні такі побічні ефекти, як сухість ротової порожнини, сонливість, зниження апетиту.

На сьогодні в розвинених країнах все частіш для лікування різноманітних захворювань застосовуються комбіновані препарати, до складу яких, окрім основної діючої речовини входить антиоксидант, що призводить до зниження побічних ефектів, а в деяких випадках і до їх нівелювання. Одним з вітчизняних антиоксидантів широкого спектру дії є тіотриазолін, який володіє антиоксидантною, протишемічною, мембраностабілізуючою, антиаритмічною, протизапальною, протівірусною та стимулюючою регенерацію клітин активністю.

Тому вирішенням даної проблеми стало створення нового більш безпечного та ефективного комбінованого лікарського засобу з L-триптофаном та тіотриазоліном, який виявляє виражені анксиолітичні, стрес-протекторні та ноотропні властивості. Розробка такого комбінованого лікарського засобу є актуальним завданням сучасної медицини та фармації. Виходячи з аналізу фізико-хімічних властивостей активних фармацевтичних інгредієнтів та аналізу фармацевтичного ринку анксиолітичних та ноотропних лікарських засобів, в якості лікарської форми для створення нового комбінованого препарату були запропоновані таблетки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану Проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексних наукових робіт Запорізького державного медичного університету, а саме «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду азагетероциклів і створення оригінальних лікарських засобів та фіксованих комбінацій лікарських препаратів» (номер державної реєстрації 0113U000802). Дисертантом особисто розроблено технологію та методики стандартизації таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є фармацевтична розробка та стандартизація нового ефективного лікарського засобу, який виявляє

виражені анксиолітичні, стрес-протекторні, ноотропні, нейропротективні та антиоксидантні властивості, на основі фіксованої комбінації L-триптофану з тіотриазоліном, що сприяє значному зменшенню проявів побічних ефектів.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

– провести аналітичну оцінку даних наукової літератури в розрізі новітніх уявлень щодо лікування захворювань ЦНС, етіологічним чинником яких є стрес, методичних підходів до створення таблетованих лікарських форм, а також перспектив застосування препаратів, розроблених на основі антиоксидантів з метою зменшення побічних ефектів. Провести маркетингові дослідження ринку анксиолітичних та ноотропних препаратів;

– здійснити комплекс досліджень з метою обґрунтування оптимального складу діючих речовин оригінальної комбінованої лікарської форми. Розробити оптимальну технологію виробництва комбінованих таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном. З урахуванням властивостей діючих речовин розробити технологічну схему виробництва нового комбінованого засобу;

– розробити методики стандартизації нового комбінованого препарату у таблетках. Розробити проект методик контролю якості (МКЯ) на отримані таблетки. Провести валідацію розроблених методик кількісного визначення вмісту активних фармацевтичних інгредієнтів у таблетках L-триптофану з тіотриазоліном. Встановити умови зберігання і термін придатності досліджуваних таблеток;

– для доведення ефективності фармацевтичної розробки здійснити дослідження специфічної дії отриманих таблеток.

Об'єкт дослідження– фармацевтична розробка та стандартизація нового оригінального комбінованого таблетованого лікарського препарату на основі фіксованої комбінації L-триптофану та тіотриазоліну.

Предмет дослідження– фармацевтична розробка науково обґрунтованого складу і технології таблеток L-триптофану з тіотриазоліном та їх стандартизація; вивчення фармако-технологічних та фізико-хімічних властивостей розроблених таблеток; розробка технологічної схеми отримання таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном; дослідження їх стабільності в процесі зберігання; розробка проекту МКЯ на отримані таблетки; доведення ефективності фармацевтичної розробки за результатами фармакологічних досліджень комбінації L-триптофану з тіотриазоліном; визначення валідаційних параметрів для розроблених методик.

Методи дослідження. З метою виконання поставлених задач у дисертаційній роботі використані органолептичні, фармако-технологічні – однорідність маси, стійкість до роздавлювання, стираність, розпадання, розчинення; фізичні та фізико-хімічні – вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), біологічні та математичні – статистична обробка результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше запропоновано оригінальну фіксовану комбінацію активних фармацевтичних інгредієнтів у відповідних дозах L-триптофану 200 мг та тіотриазоліну 50 мг для розробки нового анксиолітичного, стрес-протекторного, ноотропного засобу. Вперше методом математичного планування експерименту науково обґрунтовано склад та

розроблено технологію нового комбінованого засобу L-триптофану з тіотриазоліном в таблетках з фіксованою комбінацією L-триптофану 200 мг та тіотриазоліну 50 мг.

За результатами фармакологічних досліджень уперше виявлено потенціювання анксиолітичної, стрес-протекторної дії L-триптофану при його застосуванні з тіотриазоліном в одній лікарській формі, що визначило зниження їх терапевтичних доз у 2,5 рази.

Вперше відповідно до вимог ДФУ розроблені методики стандартизації таблеток L-триптофану з тіотриазоліном щодо ідентифікації, кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну методом ВЕРХ.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблений та стандартизований оригінальний фармакологічний засіб на основі L-триптофану та тіотриазоліну у формі таблеток. Отримані результати досліджень можуть бути застосовані при розробці нових лікарських засобів на основі анксиолітичного, ноотропного препарату в комбінації з антиоксидантом. Розроблено технологічну схему отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції, яку апробовано та впроваджено у систему лабораторії таблетованих ЛП ДП «ДНЦЛЗ» (акт впровадження від 03.09.2018). Розроблено методику кількісного визначення діючих речовин в модельній суміші, таблетковій масі та таблетках методом ВЕРХ, яку апробовано та впроваджено у систему якості АТ «Лекхім-Харків» (акт впровадження від 24.09.2018).

Розроблені методики стандартизації таблеток з плівковим покриттям L-триптофану з тіотриазоліном, які покладені в основу проекту документа «Методи контролю якості на лікарський засіб».

Результати наукових досліджень впровадженні в науково-педагогічні процеси кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії Київського медичного університету; кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів, кафедри фармацевтичної технології і біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика; кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровської медичної академії МОЗ України»; кафедри фармації навчально-наукового інституту післядипломної освіти, кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником визначено мету та основні задачі досліджень, розроблено методичні підходи, на основі яких обрано методи виконання практичної частини дисертації.

Безпосередньо автором здійснено:

- аналіз даних наукової літератури щодо лікування та профілактики захворювань ЦНС, викликаних стресом;
- експериментальні дослідження з вивчення фізико-хімічних, технологічних властивостей діючих речовин; обговорення та узагальнення результатів фармакологічних досліджень;

- розробку оптимального складу і технології нанесення плівкового покриття на таблетки-ядра L-триптофану з тіотриазоліном, які були отримані методом вологої грануляції;
- розробку методики якісного аналізу L-триптофану з тіотриазоліном в таблетках;
- розробку методики визначення L-триптофану з тіотриазоліном в таблетках методом ВЕРХ;
- проведено валідацію розроблених методик стандартизації отриманих таблеток.

Персональний внесок в усіх опублікованих працях з науковцями (Кучеренко Л. І., Мазур І.А., Беленічев І. Ф., Шишкіна С. В., Портна О. О., Черковська Л. Г., Моряк З. Б., Хромильова О. В., Скорина Д. Ю., Сорокопуд Л. Ю.) наведено за текстом дисертації, також в авторефераті у списку фахових публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на: VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (м. Харків, 13 – 16 вересня 2016 р.), VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 10 – 11 листопада 2016 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації-2017» (м. Запоріжжя, 11 – 12 травня 2017 р.), V міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи розвитку сучасної науки» (м. Київ, 15 – 16 вересня 2017 р.), V Національному з'їзді фармакологів України (м. Запоріжжя, 18 – 20 жовтня 2017 р.), III Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 14 – 15 листопада 2017 р.), V Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів та молодих вчених «ВІМСО» (м. Чернівці, 4 – 6 квітня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (м. Харків, 12 – 13 квітня 2018 р.), VIII науково-практичній конференції молодих вчених та студентів ТДМУ ім. Абуалі абні Сіно з міжнародною участю (м. Душанбе, 27 квітня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (м. Запоріжжя, 18 – 25 квітня 2018 р.).

Апробацію роботи проведено на спільному засіданні кафедр аналітичної хімії; технології ліків; токсикологічної і неорганічної хімії; органічної і біоорганічної хімії; фармацевтичної хімії; фармакогнозії, фармакології та ботаніки; фізколоїдної хімії; медичної та фармацевтичної інформатики і новітніх технологій; управління і економіки фармації, медичного та фармацевтичного правознавства; клінічної фармації, фармакотерапії та УЕФ ФПО Запорізького державного медичного університету від 21 вересня 2018 року.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць, зокрема 1 патент на винахід, 8 статей (5 статей у наукових фахових виданнях України та 3 статті у зарубіжних виданнях, всі 8 статей опубліковані у виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз), 10 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 253 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальної частини, загальних висновків, 15 додатків і списку використаних джерел. Робота ілюстрована 29 таблицями та 69 рисунками. Список використаних джерел містить 236 найменування, з них 168 кирилицею та 68 латиницею. Обсяг основного тексту – 175 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Сучасний стан медичного застосування триптофану та тіотриазоліну і їх комбінацій з іншими лікарськими засобами. Стан сучасного фармацевтичного ринку ноотропних та анксиолітичних препаратів (Огляд літератури). Проведено аналіз даних наукової літератури щодо сучасного стану медичного застосування L-триптофану та тіотриазоліну і їх комбінацій з іншими лікарськими засобами. Проведено аналіз стану сучасного фармацевтичного ринку ноотропних та анксиолітичних препаратів. Обґрунтовано актуальність та перспективи створення і стандартизації нового препарату з L-триптофаном та тіотриазоліном у вигляді таблеток.

Розділ 2. Характеристика матеріалів та методів дослідження. Представлено характеристику об'єктів і методів дослідження, наведено матеріали та обладнання, які були використані при виконанні експериментальної частини дисертаційної роботи.

Розділ 3. Розробка оптимального складу та технології таблеток на основі триптофану та тіотриазоліну методом вологої грануляції. Присвячений розробці оптимального складу і технології нового комбінованого лікарського засобу L-триптофану з тіотриазоліном у формі таблеток, вкритих плівковою оболонкою. Були проведені квантово-хімічні розрахунки, які показали, що незважаючи на можливість утворення між компонентами нестійких водневих зв'язків система L-триптофан, 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат і морфолін являє собою суміш речовин. Крім того, проведено дериватографічні дослідження, які підтвердили, що L-триптофан та тіотриазолін є сумішшю діючих речовин, які не взаємодіють між собою. Все вищенаведене дозволяє поєднати діючі речовини в одній лікарській формі у формі таблеток з плівковим покриттям.

В результаті фізико-хімічних, фармако-технологічних, а також морфометричних досліджень субстанцій L-триптофану (рис. 1) та тіотриазоліну (рис. 2), була спрогнозована, а надалі й підтверджена можливість отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції

В подальшому були проведені дослідження з вибору раціональних допоміжних речовин з метою отримання таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном методом вологої грануляції.

Були досліджені чотири групи допоміжних речовин, які мають різні фізичні та технологічні властивості, а саме: наповнювачі: a_1 - МКЦ 101 + крохмаль картопляний + магній карбонат основний, a_2 - МКЦ 101+ крохмаль картопляний + кальцій дигідрофосфат безводний, a_3 - МКЦ 101 + крохмаль картопляний + неусілін УФЛ, a_4 - МКЦ 101 + крохмаль картопляний + лактоза моногідрат; розпушувачі: b_1 - натрій кроскармелоза, b_2 - поліплаздон ХЛ 10, b_3 - натрій карбоксиметилкрохмаль, b_4 - натрій крохмальгліколят; зв'язуючі розчини: c_1 - 3 % крохмальний клейстер, c_2 - 5 % розчин ГПМЦ 5, c_3 - 3 % розчин МЦ 15, c_4 - 7 % розчин повідону 30; солубілізатори: d_1 - без солубілізатора, d_2 - твін 80, d_3 - натрій лаурилсульфат, d_4 – аеросил.

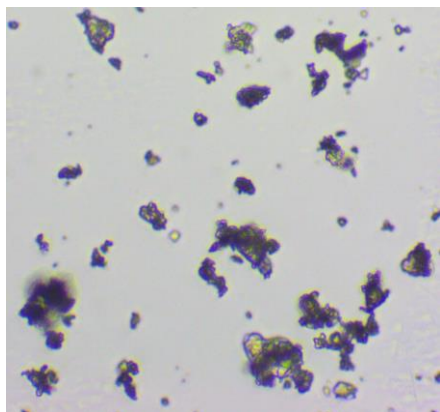


Рис. 1 Мікрофотографія порошку субстанції L-триптофану (масштаб 1:400)

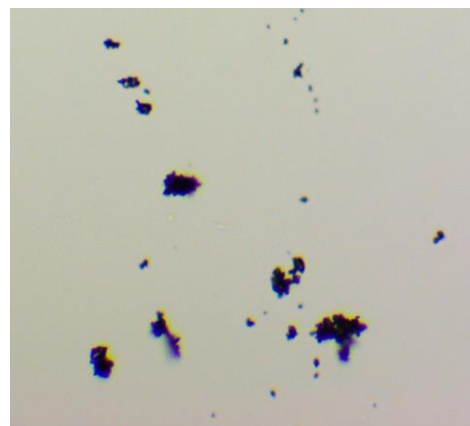


Рис. 2 Мікрофотографія порошку субстанції тіотриазоліну (масштаб 1:400)

При вивченні чотирьох якісних факторів використовували один із планів дисперсійного аналізу – чотирьохфакторний експеримент на основі греко-латинського квадрату. Досліди реалізовані у двох повторностях, що дозволило зменшити помилку експерименту. Було вивчено: процес пресування таблеток-ядер; зовнішній вигляд поверхні таблеток-ядер після виготовлення; однорідність дозування маси таблеток-ядер; стійкість таблеток-ядер до роздавлювання; стиранисть таблеток-ядер; час розпадання таблеток-ядер; зовнішній вигляд поверхні таблеток після 6-ти місяців зберігання. За результатами експериментальних досліджень проведено дисперсійний аналіз.

Після проведених фармако-технологічних досліджень та беручи до уваги результати дослідження якісного та кількісного співвідношення допоміжних речовин, запропоновано оптимальний склад таблеток-ядер (L-триптофану – 0,2000 г; тіотриазоліну – 0,0500 г; МКЦ 101 – 0,0562 г; крохмалю картопляного – 0,0561 г; магнію карбонату основного – 0,0561 г; натрію крохмальгліколяту - 0,0225 г; 5 % розчину ГПМЦ 5 – Qs; аеросилу - 0,0045г; кальцію стеарату - 0,0045г).

Отримані в лабораторних умовах таблетки-ядра, за фармако-технологічними властивостями (однорідність маси, стійкість до роздавлювання, стиранисть, розпадання, розчинення) відповідають вимогам ДФУ.

Були проведені дослідження зі створення захисної полімерної оболонки на поверхні таблеток-ядер L-триптофану з тіотриазоліном. В якості плівкоутворюючих

композицій використовували готові суміші торгової марки Opadry, які найчастіше використовуються вітчизняними фармацевтичними підприємствами в якості захисного покриття таблеток.

Проведені експериментальні дослідження дозволили вибрати плівкоутворюючу систему для нанесення покриття на основі ПВС. Доцільно використовувати 12 % суспензію Opadry II 85 F 220087 Yellow. Запропоновано параметри нанесення покриття, причому температура продукту повинна становити 35 °С. Склад таблеток L-триптофану з тіотриазоліном наведений в табл.1.

Таблиця 1

Склад таблеток L-триптофану з тіотриазоліном

Діюча речовина	Вміст речовини в одній таблетці (г)	Вміст речовини в одній таблетці (%)
L-триптофан	0,2000	44,44%
тіотриазолін	0,0500	11,11%
МКЦ 101	0,0562	12,48%
крохмаль картопляний	0,0561	12,46%
магній карбонат основний	0,0561	12,46%
натрій крохмальгліколят	0,0225	5,0%
5 % розчин ГПМЦ 5	Qs	-
аеросил	0,0045	1,0%
кальцію стеарат	0,0045	1,0%
Opadry II 85 Yellow	Qs	3,0%

В результаті проведених досліджень було встановлено оптимальний склад та технологію отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції та розроблено технологічну схему таблеток, вкритих плівковою оболонкою, з L-триптофаном та тіотриазоліном, яку апробовано на базі ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (акт впровадження від 03.09.2018 р.)

Розділ 4. Розробка методик стандартизації таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном. Наведені результати досліджень з розробки сучасних фізико-хімічних методів стандартизації діючих речовин сучасними високоточними методами.

В сучасному світі на даний час при аналізі лікарських форм все частіше використовуються фізико-хімічні методи аналізу. Відомо, що в розвинених країнах світу для визначення діючих речовин таблетованих лікарських форм найчастіше використовується метод ВЕРХ, який дозволяє одночасно ідентифікувати і кількісно визначити діючі речовини в лікарській формі. Виходячи з вищевикладеного, а також з фізико-хімічних властивостей діючих речовин, для виконання поставленої мети нами обрано метод ВЕРХ. По-перше, свою увагу ми звернули на вже існуючу методику кількісного визначення тіотриазоліну методом ВЕРХ. Були проведені

дослідження на оберненій фазі з використанням кислого фосфатного буфера (рН 3) при довжині хвилі 220 нм з використанням елюентів, що являють собою водно-метанольні суміші.

На основі даних досліджень було розроблено методику одночасного визначення L-триптофану з тіотриазоліном в модельній суміші з використанням такої ж рухомої та нерухомої фази, а також схожих умов хроматографування, які використовувалися при дослідженні тіотриазоліну.

В подальшому в лабораторних умовах було виготовлено 6 серій модельної суміші L-триптофану з тіотриазоліном в співвідношенні 4:1 (вміст діючих речовин в таблетках L-триптофану з тіотриазоліном складає: L-триптофану 200 мг, тіотриазоліну 50 мг).

Дослідження проводили з використанням модульної системи для ВЕРХ BISCHOFF (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Німеччина) зі спектрофотометричним детектором Lambda 1010 на оберненій фазі.

Для проведення кількісного визначення діючих речовин методом ВЕРХ, ми використовували:

- колонка Prontosil Eurobond C 18 розміром 250 × 4,6 мм, з діаметром часток 5 мкм чи аналогічну, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;
- елюент: 20 % метанолу - 80% фосфатного буферу, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калія та фосфатну кислоту (рН 3).
- швидкість рухомої фази: 1 мл / хв;
- довжина хвилі детектору 220 нм;
- об'єм введеної проби: 10 мкл;
- температура термостату колонки: + 25 °С;

Приклад хроматограми випробуваного розчину модельної суміші та розчину порівняння L-триптофану з тіотриазоліном наведено на рис. 3, рис. 4.

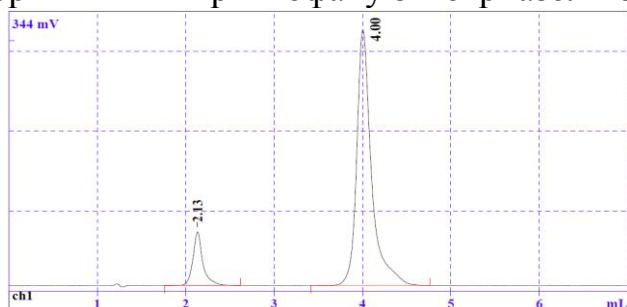


Рис. 3 Хроматограма випробуваного розчину модельної суміші L-триптофану з тіотриазоліном

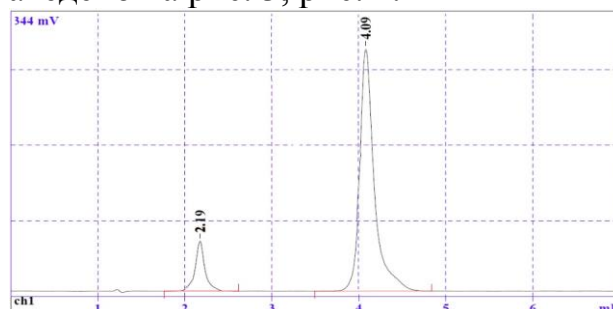


Рис. 4 Хроматограма розчину порівняння модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну

З використанням обладнання та умов хроматографування, які використовувались при визначенні діючих речовин в модельній суміші, було розроблено методику кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну в таблетковій масі. Далі було проведено аналіз виготовлених в лабораторних умовах 6 серій таблеткових мас. В результаті дослідження визначено вміст L-триптофану,

який знаходиться в межах від 197,2 мг до 204,9 мг, та тіотриазоліну - від 48,9 мг до 50,5 мг, що відповідає вимогам діючої нормативної документації.

Далі була розроблена специфікація на отримані таблетки L-триптофану з тіотриазоліном. Розробку методик проводили на 6 серіях таблеток, виготовлених в лабораторних умовах, які досліджували за наступними показниками:

Опис. Таблетки, вкриті оболонкою жовтого кольору, круглої форми, з двоопуклою поверхнею, на розламі видно ядро білого кольору. За зовнішнім виглядом мають відповідати вимогам ДФУ, ст. «Таблетки» (ДФУ 2 видання, Том 1 с. 1121).

Ідентифікація. На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманій при кількісному визначенні, час утримування основного піку L-триптофану (тіотриазоліну) має співпадати з часом утримування піку L-триптофану (тіотриазоліну) на хроматограмі розчину порівняння 1 (ДФУ, 2.2.29)

Приклад хроматографи випробовуваного розчину модельної суміші та розчину порівняння таблеток L-триптофану з тіотриазоліном наведено на рис. 5, рис. 6.

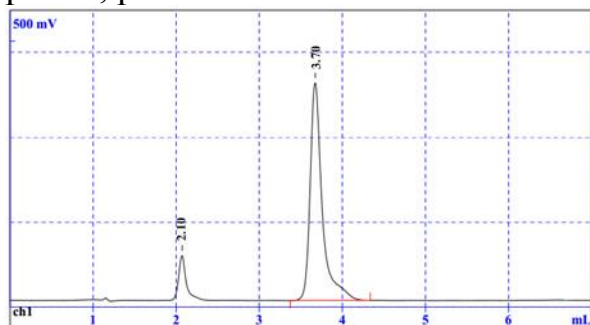


Рис. 5 Хроматограма випробовуваного розчину таблеток L-триптофану з тіотриазоліном

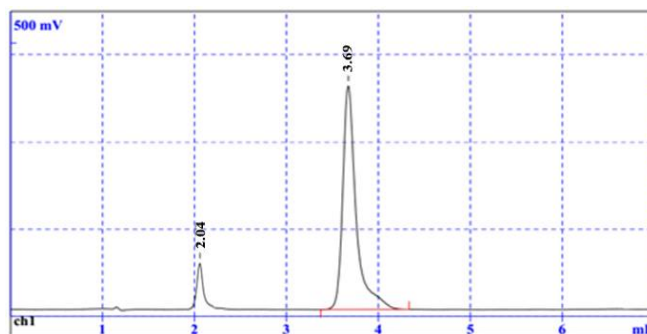


Рис. 6 Хроматограма розчину порівняння таблеток L-триптофану з тіотриазоліном

Середня маса. Середня маса таблеток L-триптофану з тіотриазоліном має бути в межах від 440,0 мг до 460,0 мг (ДФУ, 2.9.5). В ході досліджень середня маса 6 серій отриманих таблеток становила від 442,6 мг до 454,3 мг.

Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу. ДФУ, 2.9.40. Вимоги тесту вважаються виконаними за умови, якщо відносне стандартне відхилення (стандартне відхилення, виражене у відсотках до середнього результату) не перевищує 7,5 % для L-триптофану та 5% для тіотриазоліну. Тест проводили методом ВЕРХ, використовуючи 10 таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном, отриманих в лабораторних умовах. Отримані результати показали, що вміст L-триптофану в кожній з 10 випробуваних таблеток знаходиться в межах 98,24%-99,77%, а відносне стандартне відхилення становить від 0,12% до 0,85%; вміст тіотриазоліну – 98,25% - 99,95%, відносне стандартне відхилення - від 0,03% до 1,02% що відповідає вимогам ДФУ за однорідністю вмісту діючої речовини.

Розпадання. За вимогами ДФУ таблетки повинні розпадатися не більше, ніж за 15 хв (ДФУ, 2.9.1).

Дослідження проводили на кафедрі фармацевтичної хімії ЗДМУ з використанням тестеру для визначення розпадань таблеток ERWEKA серії ZTx20. В результаті проведених випробувань на розпадань було встановлено, що всі 6 серій таблеток розпалися в період від 5 хв до 10 хв, що входить у часовий проміжок, який регламентує ДФУ (15 хв).

Розчинення. Відомо, що в лікарських формах у вигляді таблеток велику увагу приділяють біодоступності. Тому для нового комбінованого препарату з L-триптофаном та тіотриазоліном нами було проведено тест «Розчинення». Визначення кількісного вмісту діючої речовини (L-триптофан), яка перейшла у розчин, було здійснено за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, 2.9.3.

Отримані результати дослідження довели, що відсотковий вміст діючої речовини (L-триптофан), яка перейшла в розчин з таблеток L-триптофану з тіотриазоліном через 45 хв., становить 95,5%, що відповідає вимогам ДФУ.

Супровідні домішки. Визначення проводили методом ТШХ. Ацетилтіосемікарбазиду – не більше 0,5 %; 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону – не більше 0,5 %; будь-яка інша домішка – не більше 0,1 %.

Сума домішок - не більше 0,3 %. (ДФУ, 2.2.27).

Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12, 2.6.13.

Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти для неводних лікарських засобів для орального застосування (ДФУ, 5.1.4):

- загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) $\leq 10^3$ КУО/г;
- загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) $\leq 10^2$ КУО/г;
- Відсутність *Escherichia coli* в 1 г.

Кількісне визначення. Випробування проведено відповідно до вимог ДФУ, 2.2.29 за методикою, яку наведено нижче. При аналізі було використано умови хроматографування та аналітичне обладнання, що й при аналізі діючих речовин в модельній суміші.

Приготування випробовуваного розчину.

Близько 450 мг (точна наважка) розтертих таблеток поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15,0 мл дистильованої води, збовтують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 5,0 мл фільтрату. Розчин застосовують свіжоприготованим.

Приготування розчину порівняння.

Розчин порівняння 1. 200 мг (точна наважка) L-триптофану розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25 мл і доводять водою до мітки.

Розчин порівняння 2. 50 мг (точна наважка) тіотриазоліну розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25 мл і доводять водою до мітки.

Розчин порівняння. 10 мл розчину порівняння 1 і 10 мл розчину порівняння 2 поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять водою до мітки.

Розчин застосовують свіжоприготованим.

Хроматографують випробовуваний розчин та розчин порівняння не менше трьох разів та розраховують середню площу піків. Дослідження проводять в умовах які зазначені вище.

Вміст L-триптофану (тіотриазоліну) (X_3) в одній таблетці, в грамах, розраховують за формулою:

$$X_3 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100}$$

де: S_1 – середнє значення площ піків L-триптофану (тіотриазоліну) в випробовуваному розчині;

S_0 – середнє значення площ піків розчину порівняння для L-триптофану та (тіотриазоліну);

m_1 – маса наважки таблеткової маси в міліграмах;

m_0 – маса наважки ФСЗ або РСЗ L-триптофану (тіотриазоліну), в міліграмах;

P – вміст основної речовини в ФСЗ або РСЗ L-триптофану (99,95%); тіотриазоліну (100%), у відсотках;

b - середня вага таблетки, в міліграмах.

Результати проведених досліджень кількісного вмісту діючих речовин в таблетках L-триптофану та тіотриазоліну (серія 1), наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну в таблетках (серія 1) методом ВЕРХ

№ п/п	L-триптофан				Тіотриазолін			
	Середня площа піку	Маса наважки розтертих таблеток, мг	Знайдено мг	Метролог ічні характеристики	Середня площа піку	Маса наважки розтертих таблеток, мг	Знайдено, мг	Метролог ічні характеристики
1	68151,850	452,1	200,85	$\bar{x} = 200,41$ $S_x = 0,70$ $t(0,95) = 2,02$ $\Delta x = 1,41$ $\Delta \bar{x} = 0,58$ $\bar{x} \pm \Delta x = 200,41 \pm 0,58$ $e^x = 0,29\%$	25115,489	449,8	50,8	$\bar{x} = 50,02$ $S_x = 0,49$ $t(0,95) = 2,02$ $\Delta x = 0,98$ $\Delta \bar{x} = 0,40$ $\bar{x} \pm \Delta x = 50,02 \pm 0,40$ $e^x = 0,80\%$
2	67895,854	451,5	199,83		24692,554	451,2	50,1	
3	67814,849	451,7	199,68		24489,542	450,4	49,6	
4	68330,147	452,2	201,42		24560,272	451,7	49,8	
5	67992,744	453,0	200,78		24807,621	450,9	50,3	
6	67806,289	452,3	199,92		24445,596	450,3	49,5	
РС	67839,226	200,0			24708,983	50,0		

* Примітка – середня маса таблеток – 450,0 мг

В подальшому було визначено вміст діючих речовин в 6 серіях таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном. Було встановлено, що в досліджених серіях вміст L-триптофану становить від 198,10 мг до 202,08 мг, тіотриазоліну – від 48,37 мг до 50,93 мг, що відповідає вимогам ДФУ (регламентація вмісту L-триптофану – 200 мг \pm 5%, тіотриазоліну – 50 мг \pm 5%).

До специфікації внесено:

Вміст $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (L-триптофану) в одній таблетці, у перерахунку на середню масу однієї таблетки, має бути: від 190 мг до 210 мг.

Вміст $C_5H_7N_3O_2S \cdot C_4H_9NO$ (тіотриазоліну) в одній таблетці, у перерахунку на середню масу однієї таблетки, має бути: від 47,5 мг до 52,5 мг.

В ході роботи розроблена специфікація на таблетки L-триптофану з тіотриазоліном, а також методика якісного та кількісного визначення діючих речовин в таблетках методом ВЕРХ. В специфікацію внесені наступні показники: опис, ідентифікація, середня маса, однорідність маси, супровідні домішки, мікробіологічна чистота, розпадання, розчинення та кількісне визначення. Розроблено проект МКЯ на таблетки з L-триптофаном та тіотриазоліном. Розроблено методику кількісного визначення діючих речовин в таблетковій масі та таблетках методом ВЕРХ, яку апробовано та впроваджено у систему якості АТ «Лекхім-Харків» (акт апробації від 24.09.2018р.).

Далі була проведена валідація розроблених методик кількісного визначення діючих речовин в таблетках L-триптофану з тіотриазоліном. ДФУ регламентує проведення валідації методик за такими показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність, правильність, робасність та прецизійність. Тому саме за цими валідаційними характеристиками ми і аналізували методики стандартизації таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном.

При проведенні валідаційних досліджень використано вищенаведені умови хроматографування та аналітичне обладнання.

Межі: вміст L-триптофану і тіотриазоліну в одній таблетці препарату повинно бути від 190 мг до 210 мг та від 47,5 мг до 52,5 мг відповідно. Критерії придатності валідаційних характеристик методики розраховували для 5 % допуску вмісту діючих речовин в препараті.

Приготування досліджуваного розчину та розчину порівняння L-триптофану та тіотриазоліну проводили відповідно до методики:

В 10 мірних колбах місткістю 25 мл поміщають вказані в табл. 3 кількості L-триптофану (серія 00120797U) та тіотриазоліну (серія 410609), в кожену колбу додають по 15 мл води очищеної, перемішують протягом 20 хв, доводять об'єм сумішей тим же розчинником до мітки та перемішують ще 5 хв. 10 мл отриманого розчину переносять в мірну колбу на 200 мл і доводять водою до мітки.

Таблиця 3

Модельні суміші

№ модельного зразку	L-триптофан		Тіотриазолін	
	Маса наважки (мг)	Вміст, в % від номінального значення	Маса наважки (мг)	Вміст, в % від номінального значення
1	2	3	4	5
1	160,00	80	40,00	80
2	170,00	85	42,50	85
3	180,00	90	45,00	90
4	190,00	95	47,50	95
5	200,00	100	50,00	100

1	2	3	4	5
6	210,00	105	52,50	105
7	220,00	110	55,00	110
8	230,00	115	57,50	115
9	240,00	120	60,00	120

Специфічність. Після приготування розчинів за методикою, яка представлена вище, проводили їх аналіз за допомогою ВЕРХ. Критеріями прийнятності є: 1) На хроматограмах розчину «плацебо» препарату (зразок 0) повинні бути відсутні піки з часом утримування, що співпадають з часом утримування L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах досліджуваного розчину; 2) Час утримання піків L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах випробовуваного розчину повинні співпадати з часом утримування піків L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах розчину порівняння L-триптофану та тіотриазоліну; 3) Піки L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах досліджуваного розчину повинні добре розділятися з піками інших можливих домішок та самих субстанцій L-триптофану та тіотриазоліну.

Специфічність методики кількісного та якісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну підтверджується тим, що: на хроматограмі розчину «плацебо» відсутні піки з часом утримування, що співпадають з часом утримування піків L-триптофану та тіотриазоліну; час утримування піків L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах досліджуваного розчину співпадають з часом утримування піків L-триптофану та тіотриазоліну на хроматограмах розчину порівняння L-триптофану та тіотриазоліну; на хроматограмах досліджуваного розчину та розчину порівняння L-триптофану з тіотриазоліном спостерігається повне розділення піків L-триптофану та тіотриазоліну.

Специфічність методики ідентифікації та кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну проілюстрована на рис. 7.

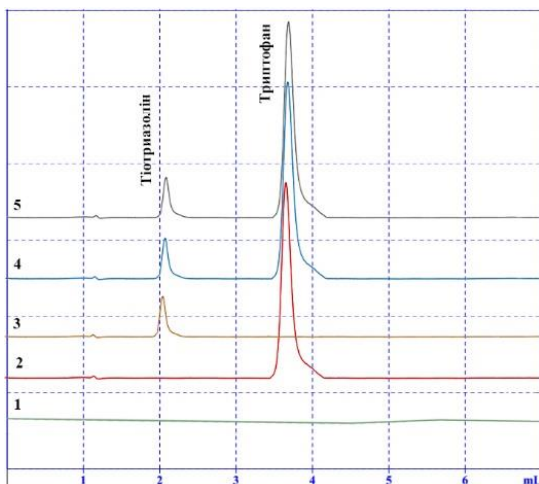


Рис. 7 Хроматограми розчинів: 1 – розчин «плацебо» препарату, 2 – модельний розчин препарату з L-триптофаном, 3 – модельний розчин препарату з тіотриазоліном, 4 – випробовуваний розчин препарату, 5 – розчин порівняння L-триптофану та тіотриазоліну

Виходячи з усього сказаного вище, методика ідентифікації та кількісного визначення L-триптофану з тіотриазоліном в препараті методом ВЕРХ є специфічною.

Правильність та прецизійність досліджували на модельних розчинах препарату з концентраціями L-триптофану та

тіотриазоліну, які відповідають 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105%, 110 %, 115 % та 120 % від їх номінального вмісту.

Результати хроматографічних досліджень модельних розчинів наведені в табл. 6, 7.

Характеристику лінійності досліджували в діапазоні концентрацій L-триптофану та тіотриазоліну від 80 % до 120 % по відношенню до номінального значення.

Графік лінійної залежності наведений на рис. 8 та 9, а результати розрахунків параметрів лінійної залежності в табл. 4 та 5.

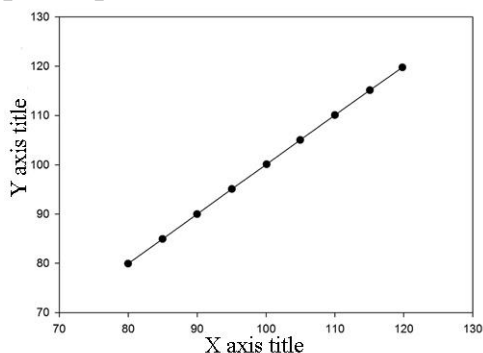


Рис. 8 Лінійна залежність знайденої концентрації L-триптофану від його введеної концентрації в нормалізованих координатах

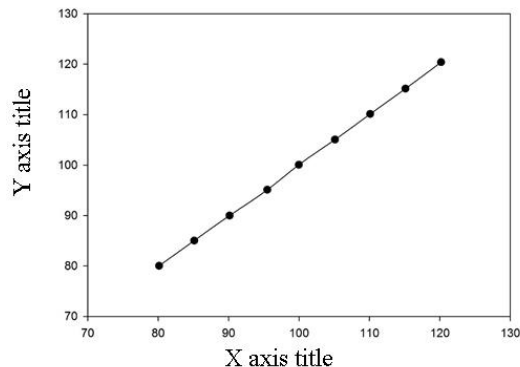


Рис. 9 Лінійна залежність знайденої концентрації тіотриазоліну від його введеної концентрації в нормалізованих координатах

Як видно з одержаних даних, вимоги до параметрів лінійної залежності виконуються.

Правильність та прецизійність методики були перевірені методом «введено-знайдено». Результати кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну в модельних розчинах в області аналітичних концентрацій та результати розрахунків метрологічних характеристик наведені в табл. 7 та 8.

Дані табл. 7 та 8, свідчать, що методика кількісного визначення L-триптофану та тіотриазоліну характеризується достатньою правильністю та прецизійністю у всьому діапазоні концентрацій (від 80 % до 120 %) та є коректною.

Таблиця 4

Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації L-триптофану від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Заключення
b	1,0017			
S _b	0,0013			
a	-0,1439	≤ 0,24	≤ 2,6	Витримується за 1 критерієм
S _a	0,1276			
SD ₀	0,0487			
SD ₀ /b	0,04861	≤ 0,84		Виконуються
r	1,0000	> 0,99810		Виконуються

Таблиця 5

Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації тіотриазоліну від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Заключення
1	2	3	4	5
b	1,0070			
S _b	0,0038381			

Продовж. табл. 5

1	2	3	4	5
a	- 0,73	$\leq 0,66 $	$\leq 2,6 $	Витримується за 1 критерієм
S _a	0,38754			
SD ₀	0,148633			
SD ₀ /b	0,148	$\leq 0,84 $		Виконуються
r	0,99994	$> 0,99809 $		Виконуються

Таблиця 6

Результати аналізу модельних розчинів, які містять від 80 % до 120 %

L-триптофану по відношенню до номінальної концентрації, їх статистичної обробки

№ розчину	Наважка триптофану, г (m _{st} = 0,2000)	Введено в % від номінальної концентрації (X _i , факт., %)	Середня площа піку (A _i st = 67617,69)	Знайдено в % від номінальної концентрації (Y _i , %)	Знайдено в % до введеного Z _i = 100 • (Y _i /X _i)
1	0,1599	79,97	54053,58	79,94	99,96
2	0,1699	84,97	57427,71	84,93	99,95
3	0,1799	89,98	60835,64	89,97	99,99
4	0,1900	95,02	64284,14	95,07	100,05
5	0,2001	100,07	67692,07	100,11	100,04
6	0,2099	104,96	71018,86	105,03	100,07
7	0,2200	110	74440,32	110,09	100,08
8	0,2301	115,08	77855,01	115,14	100,05
9	0,2396	119,8	80978,95	119,76	99,97
Середнє, Z _{ср} , % =					100,02
Відносне стандартне відхилення, RSDz, % =					0,05
Відносний довірчий інтервал Δz % = t(95 %, 9 – 1) x RSDz = 1.86 x 0.10 =					0,09
Критичне значення для збіжності результатів ΔAs, % =					1,6
Систематична помилка δ % = Z _{ср} – 100 =					0,02
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) статистична незначущість: δ < Δz : $\sqrt{9} = 0.09/3 = 0.03 \% > 0.02 \%$ Якщо не виконується 1), то δ ≤ max δ: 2) практична незначущість: δ% ≤ 0.32 × 1.6 = 0.51 % > 0.02 %					Виконується Виконується
Загальний висновок про методику					КОРЕКТНА

**Результати аналізу модельних розчинів які містять від 80 % до 120 %
тіотриазоліну по відношенню до номінальної концентрації, та їх статистична обробка**

№ розчин у	Наважка тіотриазоліну, г ($m_{st} = 0,0500$)	Введено в % від номінальної концентрації (X_i , факт., %)	Середня площа піку ($A_i^{st} = 24427,152$)	Знайдено в % від номінальної концентрації (Y_i , %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$
1	0,0400	80,11	19551,49	80,04	99,91
2	0,0425	85,10	20770,41	85,03	99,92
3	0,0450	90,12	21984,44	90	99,87
4	0,0477	95,48	23230,22	95,1	99,60
5	0,0499	99,96	24446,69	100,08	100,12
6	0,0525	105,11	25663,17	105,06	99,95
7	0,0550	110,11	26904,07	110,14	100,03
8	0,0575	115,12	28130,31	115,16	100,03
9	0,0600	120,18	29410,29	120,4	100,18
Середнє, Z_{cp} , % =					99,96
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , % =					0,17
Відносний довірчий інтервал $\Delta z \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1,89 \times 0,17 =$					0,31
Критичне значення для збіжності результатів ΔA_s , % =					1,6
Систематична помилка $\delta \% = Z_{cp} - 100 =$					0,04
Критерій незначущості систематичної помилки:					
1) статистична незначущість: $\delta < \Delta z : \sqrt{9} = 0,33 : 3 = 0,1 \% > 0,04\%$					Виконується
Якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \delta$:					Виконується
2) практична незначущість: $\delta \% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51 \% > 0,04\%$					Виконується
Загальний висновок про методику					КОРЕКТНА

За результатами дослідження встановлено, що методика характеризується достатньою прецизійністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz для L-триптофану та тіотриазоліну не перевищує критичне значення для збіжності результатів (1,6 %) (табл. 6, 7). Також методика характеризується достатньою правильністю, так як виконується критерій незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка методики задовольняє вимоги статистичної та практичної незначущості. Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності (a , SD_0/b , r) методики визначення L-триптофану та тіотриазоліну у всьому діапазоні концентрації від 80 % до 120 % від номінального значення (табл. 5, 6).

Як видно з зазначеного вище, методика визначення L-триптофану та тіотриазоліну методом ВЕРХ в діапазоні застосування методики відповідає критеріям прийнятності для валідаційних характеристик. Повна прогнозована невизначеність результатів аналізів не перевищує критичне значення, регламентоване ДФУ.

Визначена стабільність таблеток L-триптофану з тіотриазоліном, та встановлений термін придатності 2 роки за умови зберігання при кімнатній температурі та вологості 60 %.

В результаті проведених досліджень розроблено методики якісного та кількісного визначення діючих речовин в модельній суміші, таблетковій масі та таблетках L-триптофану з тіотриазоліном методом ВЕРХ, проведено експериментальні дослідження основних показників якості розроблених таблеток згідно вимог ДФУ, розроблено методику визначення тесту «розчинення» методом ВЕРХ. За результатами проведених досліджень розроблено специфікацію та проект МКЯ на таблетки L-триптофану з тіотриазоліном. Проведено валідацію методики кількісного визначення діючих речовин у таблетках L-триптофану з тіотриазоліном за показниками, які регламентує ДФУ: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність та прецизійність (збіжність).

Розділ 5. Підтвердження ефективності фармацевтичної розробки.

Присвячений вивченню анксиолітичних, стрес-протекторних та ноотропних властивостей нового комбінованого лікарського засобу L-триптофану з тіотриазоліном в експериментально обґрунтованому співвідношенні діючих речовин

Дослідження проводили на базі НМЛЦ (керівник, професор Абрамов А. В.), а також на кафедрі фармакології та медичної рецептури ЗДМУ (завідувач кафедри, професор Беленічев І. Ф.).

В ході експериментальних досліджень на білих безпородних щурах обох статей були вивчені різні співвідношення комбінацій триптофану і тіотриазоліну – 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 7:1 відповідно, в умовах тесту «підвішування за хвіст». В результаті проведених досліджень було встановлено, що найбільш виражену анксиолітичну активність виявляє комбінація триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 відповідно. Крім того встановлено, що всі досліджені комбінації з іншим співвідношенням діючих речовин (1:1; 2:1; 5:1 і 7:1) також є фармакологічно ефективними.

Встановлено, що анксиолітичний ефект комбінації триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 достовірно перевершує дію референс-препарату Ноофену.

Наступним етапом наших досліджень було визначення стрес-протективної, ноотропної та нейропротективної активності на моделі хронічного іммобілізованого стресу (ХІС). Встановлено, що комбінація триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 проявляє ноотропну та стрес-протективну активність, про що свідчить збереження умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) у тварин після моделювання хронічного іммобілізованого стресу (ХІС). За силою ноотропної та стрес-протективної дії таблетки триптофану з тіотриазоліном (4:1) достовірно перевершує ефективність Ноофену. Встановлено, що комбінований препарат

триптофану з тіотриазоліном (4:1) також проявляє нейропротективний ефект, про що свідчить достовірне зменшення вмісту продуктів окислювальної модифікації білку та стабільних метаболітів NO і активність NO-синтази в головному мозку щурів, а також добову екскрецію маркера окислювальної модифікації нуклеїнових кислот – 8-OHG в умовах ХІС. Досліджуваний препарат достовірно володіє більш вираженим нейропротективними властивостями в порівнянні з референс-препаратом Ноофеном.

Також були проведені дослідження мікробіологічної чистоти нового комбінованого препарату з триптофаном та тіотриазоліном.

В результаті проведеного експерименту слід зробити висновок, що таблетки L-триптофану з тіотриазоліном (4:1) мають виражену анксиолітичну, стрес-протективну, ноотропну та нейропротективну властивості, і за силою дії достовірно перевершують референс-препарат – таблетки «Ноофен».

Отримані дані являються експериментальним обґрунтуванням для створення на основі комбінації триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 нового лікарського засобу з анксиолітичною, стреспротективною, ноотропною та нейропротективною властивостями.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення наукової задачі, що полягає у розробці складу, технології та методик стандартизації нового лікарського засобу, до складу якого входить нейротрансмітерна амінокислота – L-триптофан та антиоксидант – тіотриазолін, який у свою чергу зменшує дію побічних ефектів L-триптофану тим самим значно розширює сферу застосувань препарату в клініці.

1. Проведено аналіз даних наукової літератури щодо сучасного стану медичного застосування L-триптофану та тіотриазоліну і їх комбінацій з іншими лікарськими засобами. Проведено аналіз стану сучасного фармацевтичного ринку ноотропних та анксиолітичних препаратів. Обґрунтовано актуальність та перспективи створення і стандартизації нового препарату з L-триптофаном та тіотриазоліном у вигляді таблеток до складу якого входить L-триптофан та тіотриазолін.

2. Вперше проведено комплекс досліджень з метою обґрунтування оптимального складу діючих речовин, які введені до комбінованої лікарської форми – таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном. Встановлено, що оптимальними дозами для активних фармацевтичних інгредієнтів є L-триптофану – 200 мг та тіотриазоліну 50 мг.

3. В ході експериментальних досліджень вперше розроблено склад таблетованої лікарської форми на основі L-триптофану та тіотриазоліну:

– при проведенні фізико-хімічних, фармако-технологічних та морфометричних досліджень субстанцій L-триптофану та тіотриазоліну, встановлено розміри часток порошку L-триптофану та тіотриазоліну, що дозволяє спрогнозувати можливість отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції;

- для створення нового комбінованого таблетованого лікарського засобу, що містить L-триптофану та тіотриазолін методом вологої грануляції досліджено 16 допоміжних речовин (наповнювачі, розпушувачі, зв'язуючі розчини, солубілізатори). Встановлено, що оптимальними допоміжними речовинами, які забезпечують всі фармако-технологічні вимоги, які висуваються до таблеткованої лікарської форми згідно вимог ДФУ (суміш МКЦ 101 + крохмаль картопляний + магній карбонат основний, натрій крохмальгліколят, 5 % розчин ГПМЦ 5, аеросил, кальція стеарат);

- розроблено склад та технологію отримання таблеток, вкритих плівковою оболонкою, L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції. Результати дослідження впроваджені в науково-педагогічну діяльність кафедри фармацевтичної технології і біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського;

- розроблено технологічну схему виробництва таблеток, вкритих плівковою оболонкою, з L-триптофаном та тіотриазоліном, яку апробовано на базі ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (акт впровадження від 03.09.2018 р.)

4. Для створених комбінованих таблеток L-триптофану з тіотриазоліном вперше розроблені оптимальні відтворювані методики їх стандартизації:

- розроблено методику для якісного та кількісного визначення діючих речовин в модельній суміші: L-триптофану та тіотриазоліну методом ВЕРХ;

- розроблено методики стандартизації діючих речовин в таблетковій масі, які в подальшому плануються до застосування під час постадійного контролю серійного виробництва таблеток;

- розроблено методику ВЕРХ для стандартизації (ідентифікація, кількісне визначення) діючих речовин в таблетках з L-триптофаном та тіотриазоліном, при цьому встановлено, що запропонована методика ВЕРХ є відтворюваною. Проведені експериментальні дослідження основних показників якості розроблених таблеток L-триптофану з тіотриазоліном згідно з вимогами ДФУ. Розроблено методику визначення тесту «розчинення» методом високоефективної рідинної хроматографії;

- за результатами проведених досліджень розроблено специфікацію та проект МКЯ на таблетки з L-триптофаном та тіотриазоліном;

- проведено валідацію методики кількісного визначення діючих речовин у таблетках L-триптофану з тіотриазоліном за параметрами, які регламентує ДФУ: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність та прецизійність (збіжність);

- вивчена стабільність таблеток L-триптофану з тіотриазоліном у процесі зберігання та визначено термін і умови їх зберігання – 2 роки за температури (15 - 25) С° і відносній вологості (60±5) %, дослідження тривають.

5. Ефективність фармацевтичної розробки підтверджено результатами фармакологічних досліджень: встановлено, що таблетки L-триптофану з тіотриазоліном (4:1) мають виражену анксиолітичну, стрес-протективну та ноотропну властивості, і за силою дії достовірно перевершують референс-препарат Ноофен.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Theoretical study of the possibility of L-tryptophan with thiotriazoline complex formation / L. I. Kucherenko, I. A. Mazur, S. A. Borsuk, O. V. Khromylova, S. V. Shishkina. *Запорозж. мед. журн.* 2018. Т. 20, № 1. С. 110-115. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

2. Вибір допоміжних речовин для отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції / Л. І. Кучеренко., І. А. Мазур, С. О. Борсук, О. О. Портна. *Фармац. часопис.* 2017. № 3. С. 31-38. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

3. Изучение ноотропных и стресс-протекторных свойств нового комбинированного лекарственного средства L-триптофана с тиотриазолином (Сообщение 2) / Л. И. Кучеренко, И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур, С. А. Борсук. *Рецепт.* 2017. Т. 20, № 6. С. 558–567. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

4. Изучение фармакологических свойств нового комбинированного лекарственного средства триптофана с тиотриазолином. Установление оптимального соотношения действующих веществ и изучение анксиолитических свойств нового комбинированного лекарственного средства триптофана с тиотриазолином (Сообщение 1) / Л. И. Кучеренко, И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур, С. А. Борсук. *Рецепт.* 2016. Т. 19, № 6. С. 696–703. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

5. Кількісне визначення L-триптофану та тіотриазоліну в модельній суміші / Л. І. Кучеренко., І. А. Мазур, С. О. Борсук, О. О. Портна. *Фармац. часопис.* 2018. № 2. С. 54-58. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

6. Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Борсук С. О. Вибір допоміжних речовин для отримання таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції. *Фармац. часопис.* 2017. № 4. С. 22-29. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

7. О постадийном контроле таблеток L-триптофана с тиотриазолином / Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, С. А. Борсук, Е. А. Портная, Г. И. Ткаченко. *Рецепт.* 2018. том № 21, №4, С. 508 – 515. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

8. Підбір оптимальних умов аналізу суміші L-триптофану та тіотриазоліну методом вискоєфективної рідинної хроматографії / Кучеренко Л. І., Борсук С. О., Мазур І. А., Черковська Л. Г., Скорина Д. Ю. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2018. Т. 11, № 2(27). С. 142-147. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).

Патент:

1. Кучеренко Л. І., Борсук С. О., Беленічев І. Ф., Мазур І. А., Стеблюк В. С. Комбінований лікарський засіб анксиолітичної стрес-протективної, ноотропної і

антиоксидантної дії: пат. № 112513 Україна. № № а 2016 04961; заявл. 04.05. 2016; опубл. 12.09.2016, Бюл. № 17 (Особистий внесок – приймав участь в патентному пошуку та в оформленні патенту).

Тези доповідей:

1. Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Борсук С. О. Актуальність створення нового комбінованого таблеткованого нейропсихотропного лікарського засобу. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України (Харків, 13-16 вересня 2016 р) : у 2 т. Т. 1. Харків : НФаУ, 2016. С. 373.

2. Кучеренко Л. І., Беленічев І. Ф., Борсук С. О. Фармакологічні аспекти створення нового лікарського засобу нейропсихотропної дії на основі L-триптофану та тіотриазоліну. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VI науково-практ. конф. з міжнар. участю (10-11 листоп. 2016 р.). Тернопіль : ТДМУ, 2016. С. 314.

3. Борсук С. О. Обґрунтування вибору лікарської форми нового комбінованого нейропсихотропного препарату. *Сучасні аспекти медицини та фармації – 2017* : тези Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студ. з міжнар. участю, присвяч. Дню науки (11-12 трав. 2017 р., м. Запоріжжя). Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. С. 142.

4. Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Борсук С. О. Дослідження анксиолітичної активності нового комбінованого лікарського засобу триптофану з тіотриазоліном. *Сучасні перспективи розвитку науки* : матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (15-16 вересня 2017 р.). Київ : МЦНД, 2017. С. 31.

5. Кучеренко Л. І., Беленічев І. Ф., Мазур І. А., Борсук С. А. Изучение анксиолитической активности нового комбинированного лекарственного средства триптофана с тиотриазолином. *V національний з'їзд фармакологів України* : тези доповідей (18-20 жовтня 2017 р.). Запоріжжя, 2017. С. 77-78.

6. Кучеренко Л. І., Борсук С. О., Портна О. О. Вибір оптимальних допоміжних речовин з метою створення таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. (14-15 листоп. 2017 р.). Харків : НФаУ, 2017. С. 122.

7. Кучеренко Л. І., Борсук С. О., Портна О. О. Вибір раціональних допоміжних речовин з метою створення таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції. *Інновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2018* : тези доп. V Міжнар. мед.-фармац. конгресу студентів та молодих вчених (Чернівці, 4-6 квітня 2018 р.) Чернівці, 2018. С. 417.

8. Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Борсук С. О. Вибір раціональних допоміжних речовин з метою створення таблеток L-триптофану з тіотриазоліном методом вологої грануляції. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народження д. ф. н. проф. О. М. Гайдукевича. (12-13 квітня 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 167-168.

Крім наведених вище опублікованих праць, результати досліджень наведені ще в 2 тезах доповідях.

АНОТАЦІЯ

Борсук С. О. Розробка технології та стандартизація нового комбінованого лікарського засобу з триптофаном та тіотриазоліном. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.03 – стандартизація та організація виробництва лікарських засобів. – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2018.

Дисертація присвячена розробці складу та стандартизації нового комбінованого лікарського препарату L-триптофану з тіотриазоліном у вигляді таблеток.

На підставі результатів фізико-хімічних та фармако-технологічних властивостей діючих речовин з використанням методу математичного планування експерименту розроблено склад і технологічну схему виробництва таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном методом вологої грануляції.

Для отриманих таблеток розроблено методики стандартизації діючих речовин. На основі досліджень розроблено проект методик контролю якості на таблетки L-триптофану з тіотриазоліном. Проведена валідація методики кількісного визначення L-триптофану з тіотриазоліном в таблетках.

Вивчено стабільність таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном у процесі зберігання та визначено термін та умови їх зберігання – термін придатності. Ефективність фармацевтичної розробки таблеток L-триптофану з тіотриазоліном підтверджено даними фармакологічних дослідження.

Ключові слова: L-триптофан, тіотриазолін, таблетки, допоміжні речовини, технологія, волога грануляція, стандартизація, ВЕРХ, валідація, стабільність.

АННОТАЦИЯ

Борсук С. А. Разработка технологии и стандартизация нового комбинированного лекарственного средства с триптофаном и тиотриазолином. – Квалификационная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.03 – стандартизация и организация производства лекарственных средств. – Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков, 2018.

Целью диссертационной работы является разработка состава и стандартизация нового эффективного лекарственного средства, которое обладает выраженными анксиолитическим, стресс-протекторным, ноотропным, нейропротективным и антиоксидантным свойствами, на основе фиксированной комбинации L-триптофана с тиотриазолином, что позволит также значительно уменьшить проявления побочных эффектов.

В работе проанализированы данные научной литературы по лечению заболеваний ЦНС, этиологическим фактором которых является стресс,

методическим подходам к созданию таблетированных лекарственных форм, а также перспективам применения препаратов, разработанных на основе антиоксидантов с целью уменьшения побочных эффектов, что подтвердило актуальность создания нового комбинированного лекарственного препарата в виде таблеток, в состав которого входит триптофан и тиотриазолин.

Впервые проведен комплекс исследований с целью обоснования оптимального состава действующих веществ, которые введены в комбинированную лекарственную форму – таблетки L-триптофана и тиотриазолина. Установлено, что оптимальными дозами для активных фармацевтических ингредиентов являются L-триптофана - 200 мг и тиотриазолина - 50 мг.

В ходе экспериментальных исследований впервые разработан состав таблетированной лекарственной формы на основе L-триптофана та тиотриазолина.

При проведении физико-химических, фармако-технологических и морфометрических исследований субстанций L-триптофана и тиотриазолина, установлены размеры частиц порошка L-триптофана и тиотриазолина, что позволяет спрогнозировать возможность получения таблеток L-триптофана с тиотриазолином методом влажной грануляции.

На следующем этапе разработки методом математического планирования эксперимента научно обоснованы состав и технология нового комбинированного препарата L-триптофана с тиотриазолином в таблетках. Проведены исследования по выбору оптимальных вспомогательных веществ с целью получения таблеток на основе L-триптофана и тиотриазолина методом влажной грануляции. Исследовано четыре группы вспомогательных веществ (наполнители, разрыхлители, связывающие растворы, солюбилизаторы), которые обладают различными физическими и технологическими свойствами. Использованы современные вспомогательные вещества как отечественного, так и зарубежного производства, которые соответствуют требованиям ГФУ и международным стандартам.

Для создания таблеток с L-триптофаном и тиотриазолином методом влажной грануляции были отобраны оптимальные вспомогательные вещества исходя из результатов анализа. Разработана технологическая схема производства таблеток L-триптофана с тиотриазолином методом влажной грануляции, которая апробирована на базе ГП «ГНЦЛС».

Разработана методика количественного определения и идентификации действующих веществ в модельной смеси: L-триптофана и тиотриазолина одним из современных методов ВЭЖХ. Для проведения анализа этим методом были подобраны подвижная и неподвижная фаза, а также оптимальные условия проведения исследования: колонка, элюент, скорость подвижной фазы, длина волны детектора, температура и объем введенной пробы. Разработана и апробирована методика ВЭЖХ для стандартизации действующих веществ в таблеточной массе L-триптофана с тиотриазолином, при этом установлено, что предложенная методика ВЭЖХ, которая в дальнейшем была использована для стандартизации действующих веществ в таблетках. По результатам проведенных исследований разработана спецификация и проект МКК на таблетки с L-триптофаном и тиотриазолином.

Разработана методика количественного определения действующих веществ в таблетках L-триптофана с тиотриазолином, которая была валидирована по таким показателям как специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и сходимость.

Изучена стабильность созданных таблеток L-триптофана с тиотриазолином в процессе хранения и определен срок и условия их хранения – 2 года в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C.

Эффективность фармацевтической разработки подтверждено результатами фармакологических исследований: установлено, что таблетки L-триптофана с тиотриазолином (4: 1) имеют выраженные анксиолитические, стресс-протективные и ноотропные свойства, и по силе действия достоверно превосходят референс-препарат Ноофен.

Ключевые слова: L-триптофан, тиотриазолин, таблетки, вспомогательные вещества, технология, влажная грануляции, стандартизация, ВЭЖХ, валидация, стабильность.

ANNOTATION

Borsuk S. O. Technology development and standardization of the new tryptophan and thiotriazoline combined drug. – Qualifying scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for a candidate degree in pharmaceutical sciences majoring in 15.00.03 – standardization and industrial engineering of medicines. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The thesis is devoted to the development and standardization of the new combined tablets with L-tryptophan and thiotriazoline.

The composition and technological scheme of L-tryptophan and thiotriazoline tableting by the method of wet granulation were developed on the basis of physicochemical, pharmacological and technological properties of active pharmaceutical ingredients using the method of mathematical planning of the experiment.

The active pharmaceutical ingredients standardization methods were developed for the laboratory series of tablets. Based on the research, a draft specifications for L-tryptophan tablets with thiotriazoline was developed. Also validation of the method for quantitative determination of L-tryptophan and thiotriazoline in tablets was carried out.

The stability of tablets with L-tryptophan and thiotriazoline during storage was studied and the term and conditions for their storage were determined. The pharmacological studies have been conducted for the developed tablets of L-tryptophan with thiotriazoline. The pharmaceutical development efficiency of L-tryptophan with thiotriazoline tablets is confirmed by pharmacological studies data.

Kew words: L-tryptophan, thiotriazoline, tablets, excipients, technology, wet granulation, standardization, high-performance liquid chromatography (HPLC), validation, stability.