Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Кучеренко Наталія Василівна**

УДК: 615.246.2:615.451.2:66.081.32

**РОЗРОБКА СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ**

**ГІПОЛІПІДЕМІЧНОГО ЗАСОБУ З ПЛЕВРОТУ ЧЕРЕПИЧАСТОГО**

15.00.01 – технологія ліків та організація фармацевтичної справи

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата фармацевтичних наук**

Харків-2008

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі товарознавства Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров’я України.

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор

**ДЕМ’ЯНЕНКО ВІКТОР ГРИГОРОВИЧ,**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедри товарознавства

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор

**ТИХОНОВА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА**,

Національний фармацевтичний університет,

професор кафедри аптечної технології ліків

кандидат фармацевтичних наук,

старший науковий співробітник

**АЛМАКАЄВА ЛЮДМИЛА ГРИГОРІВНА,**

Державне підприємство «Державний науковий

центр лікарських засобів», завідувач лабораторії

парентеральних та оральних рідких лікарських засобів

Захист відбудеться « 19 » грудня 2008 року о 1200 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02. 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. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий «\_\_\_\_\_» листопада 2008 року.

Учений секретар

спеціалізованої ученої ради

д. фарм. н., проф. Д.І.Дмитрієвський

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними ВООЗ, провідне місце серед причин високої захворюваності, передчасної інвалідізації й смертності людей займає атеросклероз і його клінічні прояви (ішемічна хвороба серця й мозку, артеріальна гіпертензія, інфаркти, інсульти й ін.).

Як свідчить світова практика, для адекватної профілактики атеросклерозу в кожному конкретному випадку артеріальної гіпертензії треба визначати рівень ліпідів крові і, якщо потрібно, у схеми лікування хворих включати препарати з гіполіпідемічною дією.

«Золотим стандартом» корекції гіперліпідемії в усьому світі визнані статини. Але використання їх із метою профілактики у дорослих і дітей обмежене внаслідок дуже небезпечних побічних дій, таких, як міопатії і рабдоміоліз.

Усе це свідчить про необхідність створення ефективних препаратів із натуральної сировини для лікування пацієнтів молодшого віку й профілактики розвитку клінічного атеросклерозу в дорослих.

Останнім часом міцеліальні гриби стали об’єктом різнобічних наукових досліджень з метою створення на їх основі лікарських препаратів з імуностимулюючою, адаптогенною, антиканцерогенною, гіполіпідемічною, антисклеротичною, тромболітичною, гіпотензивною й антибіотичною дією.

Певний інтерес викликає Плеврот черепичастий (ПЧ) – Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm.

З наукових джерел відомо, що відповідальним за гіполіпідемічну дію гриба є водорозчинний білково-полісахаридний комплекс (ВБПСК). Крім того, полісахариди гриба ПЧ виявляють імуномоделюючу, протипухлинну та антивірусну активність.

В аспекті викладеного гриб ПЧ можна вважати перспективною сировиною для досліджень, а створення лікарських препаратів на його основі – актуальною проблемою.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт НФаУ «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (№ державної реєстрації 0103U000476) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ і АМН України.

**Мета і задачі досліджень.** Метою роботи є розробка науково обґрунтованого складу, а також технології та методик контролю якості нового лікарського фітопрепарату у вигляді сиропу «Плеуротин» для профілактики та лікування гіперхолестеринемії й дисліпідемій.

Відповідно до мети дослідження були поставлені такі завдання:

* на підставі аналізу наукових джерел визначити стан досліджуваної проблеми в науці та практиці;
* проведення фармакологічного скринінгу сухої подрібненої сировини гриба Плевроту черепичастого з метою встановлення ефективної дози;
* обґрунтування умов виділення діючих речовин і проведення товарознавчого аналізу сировини - гриба Плевроту черепичастого;
* вивчення динаміки вилучення діючих речовин із сировини;
* дослідження гіполіпідемічної дії водорозчинного білково-полісахаридного комплексу, отриманого з гриба Плевроту черепичастого;
* проведення комплексу технологічних, фізико-хімічних і мікробіологічних досліджень з метою вибору оптимального складу рідкої лікарської форми;
* обґрунтування та розробка технології сиропу, а також проекту тимчасового технологічного регламенту;
* визначення основних показників якості розробленого препарату, створення проекту АНД на лікарський препарат під умовною назвою «Плеуротин»;
* вивчення специфічної активності та нешкідливості сиропу «Плеуротин»;
* біофармацевтичні дослідження препарату на основі ВБПСК.

***Об’єкти досліджень*.** Об’єктами досліджень є сировина гриба Плевроту черепичастого; водорозчинний білково-полісахаридний комплекс (ВБПСК), отриманий із висушеної сировини; сироп на основі ВБПСК.

***Предмет досліджень*.** Предметом досліджень є розробка науково обґрунтованого складу й технології виробництва рідкої лікарської форми у вигляді сиропу для перорального застосування на основі активної субстанції природного походження – ВБПСК.

***Методи дослідження*.** Для вирішення поставлених у роботі завдань застосовано загальноприйняті органолептичні, технологічні, фізико-хімічні (визначення рН, густини, в’язкості, тонкошарова та ексклюзивна хроматографія, спектрофотометрія, гравіметричний аналіз), мікробіологічні та фармакологічні (вивчення специфічної активності та нешкідливості розроблюваних експериментальних зразків на модельних патологіях) методи досліджень, що дозволяють об’єктивно оцінювати якісні та кількісні характеристики сировини, субстанції та препарату. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за ДФУ й з використанням програми Microsoft Excel.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше досліджено технологічні й фізико-хімічні параметри сировини гриба Плевроту черепичастого, підібрано умови її сушіння й подрібнення; для екстракції обрано оптимальний розчинник, співвідношення твердої й рідкої фаз та час їх контакту, а також умови очищення екстракту осадженням розчинником, за допомогою якого отримана нова субстанція.

Вивченням складу субстанції показано, що її полісахаридна частина складається з 4-х моносахаридів – глюкози, манози, галактози й фукози, а білкова – із 4-х білкових складових.

Для стабілізації субстанції в лікарській формі – сиропі – обрано оригінальну композицію коригентів – дисахарид сахароза з її моносахаридами в піранозній і фуранозній формі, а також природні консерванти.

Установлено, що субстанція має гіполіпідемічну активність, а сироп на її основі перевищує за дією як вихідну субстанцію, так і, за окремими параметрами, референсний препарат.

Досліджено фізико-хімічні, технологічні й мікробіологічні параметри субстанції та лікарської форми, які ввійшли до проекту АНД і технологічного регламенту на сироп «Плеуротин».

Роботу виконано на рівні винаходу, про що свідчить Патент України № 83530 від 25.07.2008 року.

**Практичне значення одержаних результатів.** Створено новий оригінальний препарат у формі сиропу для лікування й профілактики дисліпідемій. Розроблено проекти АНД і технологічного промислового регламенту на запропонований препарат під умовною назвою «Плеуротин».

Запропоновано методики ідентифікації та визначення кількісного вмісту діючих речовин, що ввійшли до проекту аналітичної нормативної документації.

Проведено фармакологічні дослідження препарату «Плеуротин», які свідчать про його високу гіполіпідемічну активність.

Окремі фрагменти роботи впроваджено в навчальні програми Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця (м. Київ), Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Луганського державного медичного університету.

**Особистий внесок дисертанта.** Автором особисто визначено напрямок, обсяг і методичні підходи до дослідження, проведено патентно-інформаційний пошук і аналіз наукових джерел, що стосуються сучасного стану профілактики та лікування гіперхолестеринемії та дисліпідемій; перспективи застосування в терапії цих захворювань гриба Pleurotus ostreatus; сучасного стану технології виробництва й контролю якості сиропів.

Дисертантом особисто досліджено процес екстракції сировини гриба Pleurotus ostreatus; проведено її товарознавчий аналіз; вивчено динаміку вилучення водорозчинного білково-полісахаридного комплексу з сировини гриба Pleurotus ostreatus; обґрунтовано та розроблено оригінальний склад і технологію нового лікарського засобу на основі Pleurotus ostreatus – сиропу «Плеуротин» - для лікування й профілактики гіперхолестеринемії та дисліпідемій; розроблено методики контролю якості сировини, діючої субстанції й сиропу, що ввійшли до проектів АНД; розроблено проект технологічного регламенту на виробництво препарату; узагальнено результати експериментальних досліджень з вивчення специфічної активності й нешкідливості препарату.

Персональний внесок в усіх опублікованих наукових працях зі співавторами (В.Г. Дем’яненком, А.В. Мартиновим, Ю.В. Столєтовим) вказується за текстом дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи виносилися на обговорення на: Всеукраїнській науково-практичній конференції «Фармація ХХІ століття» (Харків, 2002), науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Перспективи розвитку фармації та медицини в Україні» (Луганськ, 2003), VI Національному з’їзді фармацевтів України (Харків, 2005), ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Наука та інновації – 2007» (Дніпропетровськ, 2007).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових робіт, у тому числі 4 статті у фахових виданнях, тези доповідей -4.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальної частини, висновків, списку використаних наукових джерел і додатків. Роботу ілюстровано 28 таблицями та 13 рисунками. Бібліографія використаної літератури налічує 226 позицій, у тому числі 98 – іноземних авторів. Загальний обсяг дисертації – 151 сторінка.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Перспективи створення нового гіполіпідемічного препарату у формі сиропу на основі гриба Плевроту черепичастого.** Атеросклероз є поліетіологічним захворюванням. Серед 250 чинників ризику його виникнення головними вважаються дисліпопротеїнемії (ДЛП), що характеризуються змінами в складі, умісті й співвідношенні окремих ліпопротеїнів (ЛП) плазми крові.

Цілою низкою так званих регресійних досліджень підтверджено доцільність медикаментозної корекції гіперліпідемії. Для профілактики й лікування атеросклерозу та його ускладнень застосовується комплексна терапія, до складу якої входять, насамперед, препарати, що впливають на обмін ліпідів, а також антиоксиданти та ангіопротектори. Найефективнішим методом лікування дисліпідемій на теперішній час визнано застосування статинів. Проте серйозні побічні дії цих засобів не дозволяють використовувати їх для лікування дітей, а також з профілактичною метою.

Аналіз наукової літератури з цього питання показав, що в дослідах на тваринах висушений подрібнений гриб Плеврот черепичастий (Pleurotus ostreatus), а також його водний екстракт виявляли ліпіднормалізуючу й антиатерогенну дію, тому розробку гіполіпідемічного препарату на основі цього гриба можна вважати доцільною.

Дослідження особливостей фармакологічної дії та можливостей дозування майбутнього засобу виявило, що оптимальною лікарською формою для даного препарату є сироп, який можна рекомендувати для лікування й профілактики гіперліпідемії в дітей і дорослих.

**Методологічна основа дисертації та основні об’єкти та методи досліджень.** Подано загальну методологію проведення дослідження, характеристики діючих та допоміжних речовин, які визначають спосіб приготування сиропу на основі сировини гриба Плевроту черепичастого (ПЧ). При опрацюванні складу лікарського засобу у формі сиропу як діючу речовину було обрано водорозчинний білково-полісахаридний комплекс (ВБПСК). ВБПСК отримано з сировини гриба ПЧ, що є харчовим продуктом і широко культивується в промисловій культурі як в Україні, так і у світі.

У процесі визначення оптимального складу препарату застосовувались допоміжні речовини, які широко використовуються у фармацевтичній технології.

Для глибокого та всебічного дослідження властивостей сировини, діючої речовини та розроблюваного препарату було обрано органолептичні, фармакотехнологічні, фізико-хімічні, мікробіологічні та фармакологічні методи досліджень за загальноприйнятими методиками, які дозволяють об’єктивно оцінити властивості дослідних зразків.

**Теоретичне та експериментальне обґрунтування технології виділення діючих речовин із Плевроту черепичастого.** З метою обґрунтування доцільності розробки гіполіпідемічного препарату на основі Плевроту черепичастого необхідно було провести попереднє фармакологічне вивчення дії гриба на показники ліпідного спектра крові. Для цього було відтворено модель експериментальної гіперхолестеринемії на білих щурах лінії Вістар.

Результати визначення ліпідних показників крові щурів після утримання на атерогенній дієті, а також із додаванням сухого гриба ПЧ подано в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив холестеринової й грибної дієти на показники ліпідного спектра

крові щурів (М±m, n=8)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Група тварин | ЗХС ммоль/л | ЛПДНЩ ммоль/л | ЛПНЩ ммоль/л | ЛПВЩ ммоль/л |
| Інтактні тварини | 2.63±0,21 | 0,69±0,07 | 1,22±0,06 | 1,04±0,04 |
| Контрольна патологія | 6,14±0,56 | 1,14±0,06 | 2,96±0,03 | 0,64±0,02 |
| Грибна дієта | 3,77±0,36 | 1,06±0,03 | 1,44±0,05 | 0,85±0,02 |

Примітка. ЗХС – загальний холестерин; ЛПДНЩ – ліпопротеїни дуже низької щільності; ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності; ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності.

Відтворена експериментальна модель дисліпідемії за пропорційністю між класами ЛП відповідає ІІа типу, який є характерним для дітей і осіб молодого віку, якщо проводити паралель із людиною.

Застосування грибної дієти в експерименті призводило до зниження рівнів ЗХС на 38,6%; ЛПДНЩ – на 7%; ЛПНЩ – на 51,4%; а рівень ЛПВЩ збільшувався на 32,8% порівняно з контрольною патологією. Тобто лікувальна дія гриба ПЧ проявлялася, в основному, по відношенню до ЛПНЩ і ЛПВЩ.

У виробництві лікарських препаратів застосовують лише стандартизовану сировину. Для встановлення норм якості сировини досліджувалися ступінь її подрібненості, втрата в масі при висушуванні (вологість), уміст золи й наявність важких металів.

Подрібнення плодових тіл гриба ПЧ до розмірів часток, які проходять крізь сито з отворами діаметром 7 мм (сито № 70), виявилося оптимальним для даного виду сировини.

У результаті дослідження показників якості встановлено, що вологість сировини гриба ПЧ, становить 11,14±0,11%. Уміст загальної золи для даної сировини – 7,59±0,07%. Уміст золи, нерозчинної в 10% розчині хлористоводневої кислоти, становить 0,23±0,01%. Сульфатна зола складає 10,29±0,12%, що вказує на значну кількість у складі зольного залишку мінеральних речовин. Уміст важких металів в усіх серіях сировини не перевищував 0,0005 мг свинцю-іону в 1мл еталонного розчину.

Оптимальний режим сушіння сировини гриба ПЧ було встановлено такий: температура 500С, тривалість сушіння – 7-8 годин при нормальному атмосферному тиску.

Коефіцієнт водопоглинання сировини гриба Плевроту черепичастого було встановлено як 2,6.

З наукових джерел відомо, що відповідальним за гіполіпідемічну дію гриба ПЧ є водорозчинний білково-полісахаридний комплекс (ВБПСК). Тому наступні дослідження були присвячені виявленню умов найбільш повного виділення діючих речовин із сировини гриба.

Для вирішення поставленої задачі вивчалася екстрагуюча здатність різних екстрагентів: води очищеної, води питної й етанолу в концентраціях 20% і 40%.

У результаті досліджень виявилося, що найбільш повне вилучення екстрактивних речовин із сировини гриба ПЧ досягається при застосуванні води як екстрагента. Вихід екстрактивних речовин складає при застосуванні води очищеної 69,54±0,18%, води питної – 75,54±0,12%, що перевищує вихід екстрактивних речовин при застосуванні етанолу.

Динаміку вилучення екстрактивних речовин і ВБПСК із сировини гриба ПЧ вивчали в співвідношеннях сировина/екстрагент 1:10, 1:15 і 1:20 протягом різного часу: від 30 хвилин до 2 годин. Для екстракції використовували воду питну, як найбільш придатний екстрагент в умовах промислового виробництва. У ході дослідження виявилося, що найбільш повне вилучення екстрактивних речовин і ВБПСК із сировини гриба ПЧ досягається при співвідношенні сировина/екстрагент 1:15, тривалість екстрагування – 90 хвилин.

Досліджувалася також ефективність осадження ВБПСК 96% етанолом у різних співвідношеннях екстракт/етанол. При цьому було встановлено, що максимальна кількість ВБПСК осаджується 96% етанолом у співвідношенні екстракт/етанол 1:3.

Для оптимізації процесу в промислових умовах було проведено дослідження виходу ВБПСК із сировини гриба ПЧ при трикратному екстрагуванні. У результаті дослідження виявилося, що найбільш оптимальним є співвідношення сировина/екстрагент 1:15 при терміні екстрагування 60 хвилин. При цьому вихід цільового продукту складає 44-45%.

Отриманий ВБПСК гриба ПЧ було піддано подальшому фармакологічному вивченню, яке підтвердило його гіполіпідемічну активність.

**Розробка складу й технології сиропу з водорозчинним білково-полісахаридним комплексом гриба Плевроту черепичастого.** Виходячи з особливостей фармакологічної дії й дозування ВБПСК гриба ПЧ, було поставлено завдання розробити на його основі склад і технологію виробництва лікарського препарату для лікування й профілактики дисліпідемій ІІа і ІІб типів у осіб молодого віку й дітей.

На підставі аналізу рецептур відомих лікарських препаратів було обрано 4 склади сиропу, які досліджувалися за показниками: зовнішній вигляд, прозорість, плинність, густина. Оскільки діюча субстанція у високих концентраціях здатна утворювати густі розчини, вимогою до складу сиропоутворюючої речовини були низька в’язкість й висока плинність. Результати дослідження подано в табл. 2.

Таблиця 2

Дослідження експериментальних складів сиропів за критеріями якості

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Склад сиропу  Критерії  якості | Сахароза 55% | Глюкоза, фруктоза, сахароза (порівну, по 18%) | Сорбіт 70% | Сорбіт, сахароза (порівну, по 30%) |
| № складу | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Зовнішній вигляд | Густа рідина жовтуватого кольору | Відносно густа рідина слабо жовтуватого кольору | Дуже густа рідина, без кольору | Відносно густа рідина слабо жовтуватого кольору |
| Прозорість | Прозора | Прозора | Прозора | Прозора |
| Плинність | + | + | Зникає при стоянні | + |
| Густина | 1,2518 | 1,1814 | 1,3042 | 1,2043 |

Як видно з табл. 2, найбільш задовольняють вищевказаним вимогам склади сиропів №1, №2 і №4.

Для подальших досліджень було відібрано склади сиропів №1, №2 і №4 разом із діючою субстанцією й знову піддано вивченню за вказаними критеріями якості.

У результаті експерименту виявлено, що після внесення діючої субстанції здатність до дозування сиропу складу №1 зникає. Утворюється дуже густа маса, яку неможливо дозувати мірними ємностями. До того ж ВБПСК погано розчиняється в напівстиглому сиропі складу №1. Проте склад №4 зберігає достатню плинність, що дозволяє здійснювати досить рівномірне дозування лікарської форми, але поступається за цими ознаками складу №2. Розчинення в напівстиглому сиропі є особливістю технології лікарської форми, тому що термолабільні властивості діючої субстанції не дозволяють вносити її в сироп на стадії його приготування.

При вимірюванні в’язкості сиропів №2 і №4 були отримані наступні результати:

в’язкість сиропу складу №2 – 2,2912 ∙ 10-3 Па·с

в’язкість сиропу складу №4 – 2,3417 ∙ 10-3 Па·с.

Таким чином, за вказаними ознаками якості склад сиропу №2 виявився кращим, тому його було обрано для подальших досліджень.

Стерильність рідких оральних лікарських форм, зокрема сиропів, не є обов’язковою, проте наявність води створює сприятливі умови для росту й розмноження мікроорганізмів. Висока концентрація цукру в сиропах створює ефект консервування, але в них можуть проростати дріжджі, що розкладають цукор. Тому застосування консервантів у сиропах є необхідним.

З метою консервування нестерильних оральних лікарських форм найчастіше використовують кислоту сорбінову, суміш ніпагіну з ніпазолом 3:1, кислоту бензойну та її натрієву сіль, проте для застосування в педіатрії перевагу надають сорбіновій кислоті, яка в силу своєї простої хімічної структури сама здатна утилізуватися організмом як джерело енергії.

Для вибору найбільш оптимального консерванту та його кількості було виготовлено зразки сиропу з ВБПСК і різними концентраціями консервантів: із кислотою сорбіновою (0,1% – зразок №1; 0,05% – зразок №2) та зі сумішшю ніпагін / ніпазол 3:1 (0,1% – зразок №3; 0,05% – зразок №4).

Зразки сиропів із консервантами досліджувались за мікробіологічними критеріями ДФУ в Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України під керівництвом с.н.с., к.біол.н. Т.П. Осолодченко. Результати досліджень подано в табл. 3.

Таблиця 3

Результати дослідження мікробіологічної чистоти зразків сиропу на основі ВБПСК

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № зразка сиропу | Загальна кількість мікроорганізмів в 1 г препарату | | Наявність тест-мікроорганізмів | | | |
| бактерій | грибів | E.coli | S.aureus | P.aeruginosa | C.albicans |
| Норми | не більше 103 | не більше 102 | не допустимо | не допустимо | не допустимо | не допустимо |
| Зразок №1 | 1,3∙102 | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні |
| Зразок №2 | 1,6∙102 | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні |
| Зразок №3 | 1,5∙102 | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні |
| Зразок №4 | 4,5∙102 | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні | відсутні |

За результатами мікробіологічних досліджень як консервант було обрано кислоту сорбінову в концентрації 0,1%, яка забезпечує відповідну мікробіологічну чистоту й повну відсутність росту мікроорганізмів у лікарській формі.

Опрацьовуваний сироп має характерний специфічний запах (що віддалено нагадує шоколад) та природний солодкий смак із відтінком терпкості. Позиціонування сиропу як лікарської форми для застосування в педіатрії стало підставою для покращення смакових якостей лікарського препарату. Тому було застосовано комплекс коригентів.

Оцінку смаку сиропів із різними коригентами проведено зі застосуванням методу визначення числових індексів та за методикою А.І. Тенцової.

Окрім цього, для органолептичної оцінки смаку сиропу було складено формулу смаку за методикою І.А. Єгорова (табл. 4).

Таблиця 4

Смакова характеристика сиропу з ВБПСК гриба Плевроту черепичастого

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Буквені та числові індекси | | | | Формула смаку | Загальний смак |
| К | О | Г | С |
| 1 | 3 | 1 | 1 | О3К1С1Г1 | Солодкий, не кислий, не гіркий, не солоний |

Як видно з табл. 4, природний смак сиропу не є досконалим і потребує покращення. Для цього пропонується підкислення сиропу, тобто введення до його складу харчової кислоти. З цією метою найчастіше використовують кислоти лимонну або аскорбінову.

Вибір підкислюючої речовини та її концентрації для кожного окремого складу сиропу проводили за оцінкою основного смаку. Результати дослідження впливу концентрації харчової кислоти на смакові відчуття дегустаторів подано в табл. 5.

Таблиця 5

Вплив концентрації харчової кислоти на смакові відчуття дегустаторів сиропу

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Харчова кислота, % | Середні бали основного смаку | Середні бали смаку з точки зору об’єктивних відчуттів |
| Кислота аскорбінова 0,1 | 3,8 | 4,2 |
| Кислота аскорбінова 0,2 | 4,1 | 4,4 |
| Кислота аскорбінова 0,3 | 4,0 | 4,3 |
| Кислота лимонна 0,1 | 4,1 | 4,3 |
| Кислота лимонна 0,2 | 4,5 | 4,7 |
| Кислота лимонна 0,3 | 4,2 | 4,4 |

Як видно з табл. 5, найвищий індекс смаку (4,7) має сироп, що вміщує 0,2% кислоти лимонної. Тому на підставі отриманих даних було обрано як підкислюючу речовину кислоту лимонну з концентрацією 0,2%.

Для маскування специфічного запаху сиропу бажано додати ще й харчовий ароматизатор. Для цього було виготовлено зразки сиропу з ароматизаторами в різних концентраціях і оцінено органолептично з точки зору об’єктивних відчуттів (табл. 6).

Таблиця 6

Результати оцінки впливу харчового ароматизатора на смак сиропу за допомогою об’єктивних відчуттів

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Ароматизатор, % | Середній бал об’єктивних відчуттів |
| 1. | Ароматизатор полуничний 0,05 | 4,2 |
| 2. | Ароматизатор абрикосовий 0,05 | 3,7 |
| 3. | Ароматизатор барбарисовий 0,05 | 4,3 |
| 4. | Ароматизатор вишневий 0,05 | 3,9 |
| 5. | Ароматизатор полуничний 0,1 | 4,60 |
| 6. | Ароматизатор абрикосовий 0,1 | 4,10 |
| 7. | Ароматизатор барбарисовий 0,1 | 4,80 |
| 8. | Ароматизатор вишневий 0,1 | 4,30 |
| 9. | Ароматизатор полуничний 0,2 | 4,4 |
| 10. | Ароматизатор абрикосовий 0,2 | 4,1 |
| 11. | Ароматизатор барбарисовий 0,2 | 4,5 |
| 12. | Ароматизатор вишневий 0,2 | 4,2 |

Як видно з табл. 6, найбільший індекс смакового відчуття одержав склад сиропу №7 зі вмістом барбарисового ароматизатора в концентрації 0,1%.

На підставі проведених досліджень був запропонований сироп з ВБПСК наступного складу:

ВБПСК 17,8

Глюкози 18,0

Фруктози 18,0

Сахарози 18,0

Кислоти сорбінової 0,1

Кислоти лимонної 0,2

Ароматизатора барбарисового 0,1

Води очищеної до 100,0

У процесі розробки оптимальної технології виробництва лікарського препарату обґрунтовано спосіб одержання діючої субстанції, порядок уведення діючої та допоміжних речовин до складу сиропу, а також температурний режим виробничого процесу. Результати експериментальних досліджень дозволили розробити технологію виготовлення сиропу з водорозчинним білково-полісахаридним комплексом гриба Плевроту черепичастого, адаптувати її до виробничих умов та скласти технологічну схему, яку подано на рис. 3.

**Фізико-хімічні та біологічні дослідження препарату «Плеуротин».** З метою здійснення контролю якості запропонованого препарату в процесі виготовлення було вивчено показники якості діючої субстанції й сиропу у відповідності до вимог ДФУ, а також опрацьовано методики якісного й кількісного визначення інгредієнтів.

Для ідентифікації мономерного складу полісахаридної частини ВБПСК запропоновано метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) у системі розчинників піридин/етилацетат/льодова оцтова кислота/вода (5:5:1:2). Установлено, що ВБПСК гриба ПЧ складають моносахариди: маноза, галактоза, фукоза й глюкоза. Схему хроматограми подано на рис. 1.



Рис. 1. Схема хроматограми мономерів полісахаридної частини ВБПСК гриба Pleurotus ostreatus

Білкові компоненти комплексу визначено методом ексклюзивної хроматографії (рис. 2).



Рис. 2. Хроматограма протеоглікану з Pleurotus ostreatus на рідинному хроматографі Міліхром А-02

*Вихідна сировина, напівпродукти та матеріали*

Вода питна

Етанол 96%

Плодові тіла гриба Плевроту черепичастого

**Одержання водорозчинного білково-полісахаридного комплексу**

Сушіння сировини .Сушарка камерного типу, калорифери, термометр

**Стадія 1**

**Підготовка сировини**

Маса й вологість сировини, температура й тривалість сушіння

Подрібнення сировини.

Коренерізка з гільйотинними ножами

Просіювання сировини.

Вібросито № 70 із сіткою з нержавіючої сталі

Екстрагування сировини водою.

Реактор із паровою оболонкою й пропелерною мішалкою, бельтинг для фільтрування

Температура й тривалість екстрагування, режим вакуумування, концентрація етанолу, співвідношення екстракт/етанол, температура, вихід готового продукту

Випарювання екстракту.

Вакуум -випарний апарат

Сушіння ВБПСК.

Вакуум-сушильна шафа

Осадження ВБПСК.

Реактор, вакуум-фільтр

**Стадія 2**

**Одержання ВБПСК із сировини**

*Контроль у процесі виробництва*

Ступінь подрібнення, кількісний вихід готової сировини

**Одержання препарату «Плеуротин»**

Сахароза, глюкоза фруктоза, вода очищена

**Стадія 3**

**Приготування сиропу**

Маса інгредієнтів, температура, повнота розчинення речовин, однорідність сиропу, відсутність механічних домішок, режим роботи мішалок, тривалість перемішування

Розчинення в сиропі, проціджування.

Реактор-гомогенізатор із якірною мішалкою

Підготовка флаконів та кришок

Зовнішній вигляд флаконів, кришок, точність дозування, органолептичний контроль сиропу, герметичність закупорки

Фасування сиропу у флакони.

Флакононаповнюючий автомат

Кислота сорбінова, кислота лимонна, ароматизатор

Маркування.

Автомат для нанесення написів на етикетки, автомат для наклеювання етикеток на флакони

Закупорка флаконів кришками.

Автомат для закупорювання флаконів кришками

ВБПСК зі стадії 2

Одержання сиропу.

Реактор із паровою оболонкою

Розчинення ВБПСК у сиропі.

Реактор-гомогенізатор із якірною мішалкою, термометр

**Стадія 4**

**Фасування, пакування, маркування, відпуск готового продукту**

Комплектність, цілісність першого вскриття, правильність оформлення

Нефасований сироп, флакони, кришки, що нагвинчуються

Пакування флаконів у коробки.

Автомат для пакування

Пакування коробок у пачки.

Стіл для пакування

Листки-вкладиші, коробки, флакони з сиропом

Коробки з флаконами, пачки, групові етикетки

Склад готової продукції

Карантинний склад

Рис. 3. Схема технологiчного процесу виробництва препарату «Плеуротин»

У відсотковому вираженні білкові компоненти ВБПСК представлені наступним чином:

Компонент 1 63,57%

Компонент 2 21,64%

Компонент 3 13,55%

Компонент 4 1,24%.

Розроблено методику спектрофотометричного визначення БВПСК у сиропі «Плеуротин». ВБПСК є забарвленою сполукою й утворює розчини, що мають насичений червоно-коричневий колір із максимумом поглинання при довжині хвилі від 390 до 450 нм. Розрахунок концентрації ВБПСК у препараті проведено методом спектрофотометрії з використанням калібрувальних графіків або за допомогою значення питомого поглинання. Експериментальним шляхом встановлено, що 1%-ний розчин ВБПСК (питомий показник поглинання *Е*1%) має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 402нм.

Показниками якості сиропу «Плеуротин» є показник заломлення, густина, рН і кількісний уміст цукрової частини.

Показник заломлення, n20D 1,4732–1,4734

Густина, ρ(г/см3) 1,3687–1,3724

рН 5,25–5,32

Кількісний уміст цукрової частини, % 73,07–73,24.

Кількісний уміст цукрової частини сиропу «Плеуротин» визначено методом гравіметрії за методикою ДФУ.

На підставі проведених досліджень розроблено проекти АНД на сировину, діючу субстанцію – ВБПСК й сироп «Плеуротин», які регламентують їх якість.

Дослідження зразків сиропу «Плеуротин» за показниками якості довели стабільність його складу при зберіганні протягом 1,5 року при температурі 18±20С у флаконах зі скла.

**Біологічні дослідження препарату «Плеуротин»** проводились на кафедрі фармакології Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. С.М. Дроговоз та доц. Ю.В. Столєтова.

Препаратом порівняння в дослідах був «Ловастатин-КМП» (ВАТ «Київмедпрепарат»). Вибір препарату порівняння засновано на східному механізмі дії «Ловастатину-КМП» і ВБПСК – зворотному інгібуванні ключового ферменту синтезу холестерину в печінці - 3-гідроксі-3-метилглутарил – коензим А-редуктази. Дослідження проводились на щурах-самцях лінії Вістар, приблизно одного віку й ваги (160,0 – 180,0 г).

Фармакологічні випробування довели, що за абсолютними показниками зниження рівнів ЗХС, ЛПДНЩ і ЛПНЩ «Плеуротин» поступається «Ловастатину-КМП», проте за такими ж показниками зниження рівня ТГ і підвищення рівня ЛПВЩ – перевищує референс-препарат.

За кількісними характеристиками впливу на рівні ліпідів сироватки крові сироп на основі БВПСК виявляє достатній ефект. Активність «Плеуротину» відносно показників ліпідного спектра крові перевищує активність діючої субстанції в чистому вигляді.

Специфічність дії розробленого препарату на певні фракції ліпідного спектра крові дозволяє рекомендувати його для лікування й профілактики дисліпідемій ІІа і ІІб типів у осіб молодого віку й дітей.

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що виявляється в розробці складу, промислової технології та методів стандартизації сиропу гіполіпідемічної дії на основі водорозчинного білково-полісахаридного комплексу гриба Плевроту черепичастого.
2. Теоретично та експериментально доведено доцільність створення лікарського засобу гіполіпідемічної дії на основі гриба Pleurotus ostreatus.
3. Досліджено показники якості сировини гриба Плевроту черепичастого: вологість; уміст загальної золи; золи, нерозчинної в хлористоводневій кислоті; сульфатної золи; важких металів. Визначено коефіцієнт водопоглинання подрібненої сировини гриба Плевроту черепичастого, який дорівнює 2,6. Встановлено режим сушіння сировини гриба ПЧ, згідно з яким температура становить 500С, тривалість 7–8 годин при нормальному атмосферному тиску.
4. Досліджено вплив різних чинників на процес екстракції сировини гриба Pleurotus ostreatus. Показано, що в умовах промислового виробництва екстракцію слід проводити водою питною при 500С протягом 60 хвилин. Оптимальним є співвідношення сировина/екстрагент 1:15.
5. Проведено вивчення процесу очистки водорозчинного білково-полісахаридного комплексу гриба Плевроту черепичастого. Показано, що найефективніше ВБПСК осаджується при співвідношенні екстракт/етанол 96% 1:3.
6. Розроблено методики визначення якісного й кількісного складу водорозчинного білково-полісахаридного комплексу гриба Pleurotus ostreatus. Для ідентифікації ВБПСК запропоновано методи тонкошарової й ексклюзивної хроматографії, а для визначення кількісного умісту діючої субстанції в сировині – метод гравіметрії, в лікарській формі – метод абсорбційної спектрофотометрії.
7. Теоретично та експериментально обґрунтовано склад сиропу гіполіпідемічної дії на основі ВБПСК гриба Плевроту черепичастого: ВБПСК 17,8; глюкози 18,0; фруктози 18,0; сахарози 18,0; кислоти сорбінової 0,1; кислоти лимонної 0,2; харчового ароматизатора барбарисового 0,1; води очищеної до 100,0. Обґрунтовано спосіб одержання діючої субстанції, порядок уведення діючої та допоміжних речовин до складу сиропу, а також температурний режим виробничого процесу. Складено проект технологічного регламенту на виробництво лікарського препарату «Плеуротин».
8. Визначено органолептичні, фізико-хімічні, мікробіологічні та технологічні показники якості препарату «Плеуротин». Різні серії препарату характеризуються стабільними показниками якості. Розроблено методики ідентифікації та кількісного аналізу діючої субстанції (водорозчинного білково-полісахаридного комплексу), на підставі чого розроблено аналітичну нормативну документацію для контролю якості сиропу «Плеуротин» в процесі його виробництва та зберігання.
9. Встановлено термін зберігання сиропу «Плеуротин» протягом 1,5 року при температурі 18±20С у скляних контейнерах.
10. Проведено фармакологічні дослідження сировини, водорозчинного білково-полісахаридного комплексу гриба Плевроту черепичастого й препарату «Плеуротин». Доведено гіполіпідемічну дію досліджуваних об’єктів. Встановлено, що допоміжні речовини покращують активність сиропу порівняно з дією ВБПСК в чистому вигляді.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Дем’яненко В.Г. Гіполіпідемічна дія сухого екстракту гриба Pleurotus ostreatus / В.Г. Дем’яненко, Н.В. Кучеренко, Ю.В. Столєтов // Клінічна фармація. – 2006. - № 1. – С. 36-39. (Особистий внесок: підготовка зразків, участь у експерименті, узагальнення результатів, підготовка статті).
2. Кучеренко Н.В. Дослідження умов вилучення діючих речовин і товарознавчий аналіз сировини гриба Плевроту черепичастого / Н.В. Кучеренко, В.Г. Дем’яненко // Фармацевтичний журнал. – 2006. - № 3. – С. 86-90. (Особистий внесок: планування експерименту, підготовка зразків, експериментальна частина досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті).
3. Кучеренко Н.В. Вивчення динаміки вилучення діючих речовин із сировини гриба Плевроту черепичастого / Н.В. Кучеренко, В.Г. Дем’яненко // Фармацевтичний журнал. – 2006. - № 4. – С. 74-77. (Особистий внесок: планування експерименту, підготовка зразків, експериментальна частина досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті).
4. Кучеренко Н.В. Розробка методик стандартизації водорозчинного білково-полісахаридного комплексу, отриманого з гриба Pleurotus ostreatus / Н.В. Кучеренко, А.В. Мартинов, В.Г. Дем’яненко // Фармацевтичний журнал. – 2008. - № 1. – С. 92-95. (Особистий внесок: планування експерименту, підготовка зразків, експериментальна частина досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті).
5. Дем’яненко В.Г. Розробка препарату з гриба Вьошенка звичайна / В.Г. Дем’яненко, Н.В. Кучеренко // Фармація ХХІ століття: Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф., Харків, 23-24 жовтня 2002 р. – Х., 2002. – С.40-41.
6. Кучеренко Н.В. Роль і місце сучасних вітчизняних лікарських препаратів гіпохолестеринемічної дії в системі сімейної медицини / Н.В. Кучеренко, Н.Ф. Бенюх, О.П. Гудзенко // Перспективи розвитку фармації та медицини в Україні: Матеріали наук.-практ. конф. молодих учених і студентів, Луганськ. – Український медичний альманах. – 2003. – Том 6, №6 (додаток). – С.85-86.
7. Кучеренко Н.В. Розробка технології гіпохолестеринемічного засобу з гриба Вьошенка звичайна / Н.В. Кучеренко, В.Г. Дем’яненко // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: Матеріали VІ Національного з’їзду фармацевтів України, Харків, 28-30 вересня 2005 р., - Х., 2005. –С.742.
8. Кучеренко Н.В. Дослідження показників якості сиропу гіполіпідемічної дії на основі гриба Pleurotus ostreatus / Н.В. Кучеренко, В.Г. Дем’яненко // Наука та інновації – 2007: Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., Дніпропетровськ, 16-31 жовтня 2007 р. – Софія, 2007. – С. 30-31.

# АНОТАЦІЯ

**Кучеренко Н.В. Розробка складу та технології гіполіпідемічного засобу з Плевроту черепичастого.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – Технологія ліків та організація фармацевтичної справи. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2008.

Уперше досліджено технологічні й фізико-хімічні параметри сировини гриба Плевроту черепичастого, підібрані умови її сушіння й подрібнення; для екстракції обрано оптимальний розчинник, співвідношення твердої й рідкої фаз та час їх контакту, а також умови очищення екстракту осадженням розчинником, за допомогою якого отримана нова субстанція – водорозчинний білково-полісахаридний комплекс (ВБПСК).

На підставі результатів фізико-хімічних, технологічних і мікробіологічних досліджень розроблено оптимальний склад та раціональну технологію сиропу з ВБПСК під умовною назвою «Плеуротин». Запропоновано показники якості діючої субстанції й препарату та методики їх визначення.

Встановлено, що субстанція має гіполіпідемічну активність, а сироп на її основі перевищує за дією як вихідну субстанцію, так і, за окремими параметрами, референсний препарат.

**Ключові слова:** атеросклероз,ліпіди крові,дисліпідемія, Плеврот черепичастий, Pleurotus ostreatus, водорозчинний білково-полісахаридний комплекс, сироп, технологія.

**АННОТАЦИЯ**

**Кучеренко Н.В. Разработка состава и технологии гиполипидемического средства из Вешенки обыкновенной.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.01. – Технология лекарств и организация фармацевтического дела. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2008.

В работе теоретически и экспериментально обоснованы научно-методические подходы к разработке состава и технологии лекарственного препарата на основе впервые полученного водорастворимого белково-полисахаридного комплекса (ВБПСК), выделенного из гриба Вешенки обыкновенной.

Проведенный фармакологический скрининг сырья гриба Вешенки обыкновенной показал перспективность разработки лекарственного препарата на его основе. Использование данного гриба в диетическом питании на фоне атерогенной диеты дает гиполипидемический эффект. Действие гриба проявляется, в основном, по отношению к ЛПНП и ЛПВП, уровни которых являются диагностическими при атеросклерозе и дислипидемии.

Впервые исследованы технологические и физико-химические параметры сырья гриба Вешенки обыкновенной, подобраны условия его сушки и измельчения; для экстракции выбраны оптимальный растворитель, соотношения твердой и жидкой фаз и время их контакта, а также условия очистки экстракта осаждением растворителем, с помощью которого получена новая субстанция – ВБПСК.

Исходя из особенностей фармакологического действия и дозирования ВБПСК, обоснован выбор лекарственной формы – сиропа – для лечения и профилактики дислипидемий ІІа и ІІб типов у лиц молодого возраста и детей.

Проведены комплексные исследования по созданию сиропа на основе ВБПСК, которые включают изучение его органолептических, технологических, физико-химических и микробиологических характеристик.

Теоретически и экспериментально обоснован выбор сиропообразующей основы. Показано, что наилучшим является состав, содержащий сахарозу, глюкозу и фруктозу в равных соотношениях.

На основании органолептических исследований подобраны оптимальные концентрации корригентов вкуса и запаха.

В результате микробиологических исследований выбран консервант (кислота сорбиновая) и его оптимальная концентрация в сиропе (0,1%).

В процессе разработки технологии обоснован порядок и условия введения компонентов в препарат. Разработан проект технологического регламента.

Определены и изучены показатели качества действующей субстанции – ВБПСК – и сиропа на ее основе, под условным названием «Плеуротин».

Показано, что полисахаридная часть ВБПСК состоит из 4-х моносахаридов – глюкозы, маннозы, галактозы и фукозы, а белковая – из 4-х составляющих.

Разработаны методики количественного определения белковых составляющих (метод эксклюзивной хроматографии) и ВБПСК (метод абсорбционной спектрофотометрии) в сиропе.

На препарат «Плеуротин» разработан проект АНД. Технология сиропа и методики оценки его качества апробированы в условиях производства на фармацевтической фабрике КП «Луганская областная фармация» и ОАО «Луганский химико-фармацевтический завод».

Фармакологическими исследованиями установлено, что препарат «Плеуротин» проявляет гиполипидемический эффект. Активность сиропа по отношению к показателям липидного спектра крови превышает активность субстанции в чистом виде, а по отдельным показателям – референс-препарат «Ловастатин-КМП».

Способ получения ВБПСК был запатентован. Патент Украины на изобретение № 83530 от 25.07.2008 года.

Фрагменты работы внедрены в учебные программы ряда вузов страны, что подтверждено соответствующими актами внедрения.

**Ключевые слова:** атеросклероз, липиды крови, дислипидемия, Вешенка обыкновенная, Pleurotus ostreatus, водорастворимый белково-полисахаридный комплекс, сироп, технология.

**SUMMARY**

**Kucherenko N.V. Elaboration of compose and technology of the hypolipidaemic remedy of Oyster mushroom.** – Manuscript.

A Thesis for the scientific degree of candidate of pharmaceutical sciences on specialty 15.00.01 – Technology of drugs and organization of pharmaceutical business. – National University of Pharmacy, Kharkov, 2008.

For the first time the technological and physical-chemical parameters of raw materials of Oyster mushroom have been investigated; conditions of its drying and growing have been selected; the optimum solvent, ratio of solid and liquid phases with time of its contact for extraction, conditions of extract cleaning by means of precipitation by solvent have been picked out. A new substance - water-soluble protein polysaccharide complex (WSPPC) – has been obtained.

Based on the results of physical-chemical, technological and microbiological researches the optimum composition has been developed and the rational formulation of syrup with WSPPC has been proved. The drug and working substance parameters and methods for determination have been suggested. The syrup properties have been studied.

A hypolipidaemic activity of the drug and substance has been determined. A syrup with WSPPC exceeds the activity both of the substance and the reference-drug (by the same parameters).

**Key words:** atherosclerosis, blood lipids, dislipidaemia, oyster mushroom, Pleurotus ostreatus, water-soluble protein polysaccharide complex, syrup, technology.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>